

31156003855486

i

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE
DANS L'INTESTIN, LE FOIE ET LE SERUM DE LA SOURIS ET
DU RAT, SOUS CERTAINES CONDITIONS EXPERIMENTALES

W
4
B4C3C
1971
Ex. 2-

par

CLAUDE CHARUEL

Ingénieur biochimiste INSA (Lyon, France)

Thèse présentée au département de Pathologie de la Faculté de
Médecine de l'Université de Sherbrooke, en vue de l'obtention de
la maîtrise en Sciences (M.Sc.) option Biologie Cellulaire

Approbation du Jury

Sherbrooke, Québec, Canada, 1971.

SOMMAIRE

L'étude de la phosphatase alcaline fut entreprise biochimiquement, histochimiquement, et morphologiquement, principalement dans le duodénum et le foie de souris traitées à différents régimes, ou à des injections d'antimétabolites: le 5 Fluorouracile (5 FU, étudié aussi chez l'homme et le rat, sous diètes particulières) et le cycloheximide; ce dernier entraîne une baisse très nette du taux d'AlPase dans l'intestin et une disparition de l'enzyme de l'appareil de Golgi sans lésions particulières, à doses relativement faibles, et une hausse dans le foie, conjointement à une mobilisation des graisses. Dans le sérum, semble se produire une hausse d'activité de l'isoenzyme hépatique et une baisse quant à l'isoenzyme intestinale, celle qui est sensible à l'administration d'un régime gras. Tous ces résultats sont confirmés par électrophorèse sur acrylamide de chacun des extraits normaux ou traités dans les conditions déjà décrites.

Les cinétiques traduisent, dans nos extraits, l'existence d'un pH critique (10), en deçà duquel la loi michaélienne est normale, et au delà duquel 2 états de la molécule enzymatique -à ce stade de purification- semblent coexister.

L'inhibition par la L phénylalanine, tant dans l'intestin, que dans le foie, ou le sang de souris, se révèle de type incompétitif, et dépend du pH, et de la concentration de Mg -l'effet activateur du Mg sur l'enzyme étant lui-même relié au pH-. Cependant cette technique ne paraît pas satisfaisante pour aborder une détermination précise d'un type d'isoenzyme sur laquelle l'action de l'AA serait spécifique.

REMERCIEMENTS

A celles et ceux qui, par leurs privations, leur appui et leurs conseils, ont contribué, directement, ou indirectement, à leur élaboration, je dédie ces quelques pages.

Je tiens à exprimer plus particulièrement ma gratitude envers:

- Mes parents .
- Les Docteurs Hugon, Petitclerc, et Bounous, à qui je dois un travail libre, agréable, et de judicieux conseils.
- Les Docteurs H. Navert et Gahan-Maggi, pour la lecture de ce mémoire.
- Tous les membres de ce laboratoire, qui ont su m'accueillir avec beaucoup de gentillesse et de simplicité.
- La délégation générale du Québec, dont j'ai beaucoup apprécié la compréhension et le soutien, tant au Québec, qu'à Paris.
- D. Ménard, pour l'aide compétente qu'il m'a apportée en microscopie électronique, et en histologie.
- Et Pauline Picard, pour la dactylographie du texte et des figures.

LISTE DES ILLUSTRATIONS
PRESENTES DANS LE TEXTE

MATIERES	PAGES
Noyau Imidazole de l'histidine	2
Formule de l'acide sialique (N acetyl neuraminique)	3
Courbe d'inactivation thermique de l'ISAP ("Intestinal seric AlPase")	9
Type de répartition des différentes phases obtenues après centrifugation d'extraction de l'AlPase au N butanol	13
Formule du 5 fluorouracile (5 FU)	25
Formule du cycloheximide	26

LISTE DES ABREVIATIONS EMPLOYEES

AA:	Acide Aminé.
AlPase:	Phosphatase alcaline.
Acti.:	Activité.
AN:	Activité normale (dans les tableaux).
Béta:	Bétaglycérophosphate.
D.O.:	Densité optique.
Duod.:	Duodénum.
E:	Enzyme (dans les équations réactionnelles).
I:	Force ionique.
j:	Jour.
Jej.:	Jéjunum.
K_M :	Constante apparente d'affinité d'une enzyme pour son substrat.
K_S :	Véritable constante d'affinité de l'enzyme (<u>pure</u>) pour son substrat.
L φ :	L phénylalanine.
mg:	Milligramme.
mm:	Millimicrons (utilisé en densité optique).
mmoles:	Millimicromoles.
mn:	Minute.
M:	Métal (dans les équations réactionnelles.)
Pi ou PO_4^{---} :	Phosphate inorganique (libre).
Phenyl:	Phénylphosphate.
PNP:	Paranitrophénol.
PNPP:	Paranitrophénylphosphate.

PPi:	Pyrophosphate.
prot.:	Protéine.
S:	Substrat.
TPPase:	Thiaminepyrophosphatase.
V_M :	Vitesse maximum de réaction enzymatique extrapolée à une concentration de substrat supposée infinie.
I.S.A.P.	Isoenzyme AlPase d'origine intestinale, dans le sérum

TABLE DES MATIERES

	PAGES
INTRODUCTION	1
CHAPITRES:	
I) Matériel et Méthodes	12
A) Extraits tissulaires	12
B) Etudes morphologiques et histochimiques	14
C) Dosages spectrophotométriques	15
D) Electrophorèse et scanning	19
E) Inhibition à la L phénylalanine	24
F) Injections de drogues.....	25
II) Résultats	
A) Répartition biochimique de l'AlPase	28
B) Quelques facteurs de variations du taux d'AlPase ..	28
C) Pattern électrophorétique	29
D) Cinétiques	31
E) Action des antimétabolites	32
1) cycloheximide	32
2) 5 FU.....	38
F) Modalités d'action de la L phénylalanine	40

III) Discussions	PAGES
A) Généralités	46
B) Cinétiques	50
C) Antimétabolites	53
D) Action des Acides aminés	61
CONCLUSIONS	66
BIBLIOGRAPHIE	71
LEGENDES:	
Schémas	97
Tableaux	100
Courbes	103
Photos	111
SCHEMAS	121
TABLEAUX	131
COURBES	142
PHOTOS	161

INTRODUCTION

La phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1, orthophosphoric monoester phosphohydrolase aspécifique) est une métallo enzyme en 2 sous-unités codées par le même gène, donc un dimère, à noyau zincique; elle comporte de la sérine à son centre actif.

Son poids moléculaire est de l'ordre de 90,000 pour la phosphatase d'E. coli, comprenant 2 atomes de Zn structuraux, et deux fonctionnels protégés de l'action de l'E.D.T.A. par le phosphate inorganique (M. LAZDUNSKI, H. PETICLERC, D. CHAPPELET et C. LAZDUNSKI) (B 65, 66 et 69).

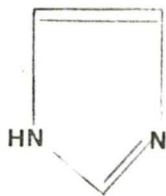
D'où les représentations théoriques de l'enzyme données par les schémas 1A et B.

Le mécanisme enzymatique lui-même est donné par le schéma 2. De plus en plus, on tend à rapprocher les phosphatases alcalines des espèces supérieures de ce modèle, que ce soit:

- pour l'intestinale de veau étudiée par ENGSTROM (PM: 120 à 130,000), ou purifiée par MORTON (B 27 et 96)
- ou pour la placentaire humaine (PM: 116,000 en 2 monomères de 58,000) étudiée récemment par GOTTLIEB et al puis FISHMAN et al (B 36, 42, 84, 85) et LEROUX et al (B 72).

Dès 1960 LAZDUNSKI (B 67 et 68) faisait reposer l'activité phosphatase sur la présence au centre actif; d'un ou deux groupes imidazole basiques,

-type histidine:



; d'une fonction contenant du soufre, et, d'au moins, un atome de Zn, et un groupe sérine:



Seules les enzymes à Zn ou Cu sont actives, et une perte de Zn entraîne, non pas une baisse d'activité, mais une baisse du taux d'enzyme lui-même (LUECKE, B 79).

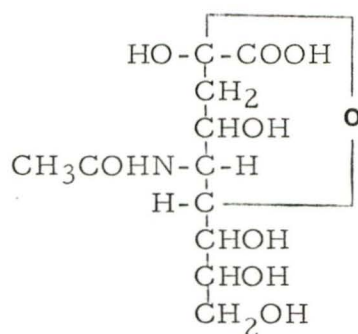
Depuis, les travaux de LAZDUNSKI et PETICLERC (B 69) se sont orientés sur le mécanisme d'action de cette enzyme, s'attachant plus particulièrement aux cinétiques de phosphorylation et déphosphorylation, c'est-à-dire de formation d'un complexe enzyme-phosphate via les sérines; puisqu'il semble désormais acquis qu'existent deux centres actifs sur la molécule de phosphatase.

WILSON et RAID (B 148) se sont également penchés récemment sur un tel mécanisme.

Notons également que l'activité de cette enzyme est indissociable de la présence de magnésium, une carence de cet ion entraînant, indirectement une chute de phosphatase alcaline (PIMSTONE, B 112). Nos expériences le confirmeront de façon plus sélective. Enfin l'enzyme intestinale ou plus exactement, son activité, résiste à la digestion tryptique -ce qui ne saurait étonner compte tenu de sa localisation duodénale, où est déversée constamment l'enzyme pancréatique (sous for-

me trypsinogène).

Elle contient probablement des dérivés glucidiques (hexoses, hexosamines) mais probablement pas, comme celle des cellules Hela (B 127) une chaîne acide sialique terminale, puisqu'elle résiste très bien à la neuraminidase:



Acide sialique
ou
N acetyl neuraminique

La différenciation des nombreuses formes de phosphatases selon leurs origines est rendue possible par les méthodes suivantes:

- Immunologie
- Chromatographie
- Inactivation par la chaleur ou les agents chimiques; et méthodes cinétiques, activation ou inhibition, spécificité de substrat, et électrophorèse,

auxquelles nous nous sommes plus particulièrement attachés.

Différentes substances exercent des effets inhibiteurs:

-L'E.D.T.A. (éthylène diamine tetracetic acid), les citrates, sulfates, les cations, les acides aminés, le phosphate inorganique (inhibition compétitive) et en général les agents chélatant les métaux.

Parmi les acides aminés, citons la L phénylalanine dont nous tenterons d'approcher le mécanisme d'action (FERNLEY, B 30; INGLIS et FISHMAN, B 32 et 33; GHOSH et FISHMAN, B 37 et 38), et la L homoarginine (FISHMAN, B 34) inhibant préférentiellement les isoenzymes osseuse et hépatique du sérum.

-Enfin l'urée, selon 2 modes d'action d'après le tissu:

.la première: instantanée; se traduisant par une inhibition réversible non compétitive.

.la seconde: irréversible et dépendant du temps, et de la température.

"Spécificité" de substrat

En fait, la phosphatase alcaline, dont on ignore le substrat naturel, agit sur d'innombrables monoesters rapidement hydrolysés, outre les orthophosphoamides, phosphocréatine, enol phosphate et phosphoenolpyruvate (cycle de Krebs) (MORTON, B 97).

Il apparaît qu'elle s'attaque à tout phosphate organique (LAZDUNSKI et OUELLET, B 68).

Si F. MOOG (B 88) s'attache énormément aux taux différentiels d'hydrolyse du Bétglycéro et du phényl phosphates, nos études montreront qu'il n'en faut pas moins garder beaucoup de prudence sur les conditions expérimentales employées, eu égard aux considérations d'ordre cinétique, et au fait que l'alcaline s'attaque à de nombreux substrats artificiels.

Fonctions

1. Son rôle premier est, évidemment, la libération de phosphate inorganique tant à partir d'esters phosphoriques qu'à partir du pyrophosphate (COX, B 17; MELANI, B 86). Cette activité PPase serait inhibée, la première, par absence du magnésium (NAYUDU et MILES, B 104), cation dont nous soulignons l'importance. Quant à son action sur le phosphate de pyridoxale (SRIKANTIAH, B 128, 129), iso-enzyme très répandue, elle pose le problème de la régulation par l'AlPase, d'autres systèmes enzymatiques, en particulier les transférases (PETERKOFISKY, B 111).

2. La fonction physiologique de la phosphatase reste pratiquement inconnue, et n'a guère évolué depuis 1950, où elle s'est vue attribuer tous les rôles possibles:

- soit dans la digestion des glucides (STENRAM, B 131, TUBA and al, B 64 et 137); les monosaccharides augmentent, en effet, l'activité intestinale.
- soit dans la digestion des lipides (TUBA and al, B 136): l'activité, nous le verrons, est augmentée par un régime gras.
- ou dans la digestion des protides (TUBA and al, B 138): les régimes riches en protéines, voire même toute une série d'acides aminés (histidine surtout), augmentent plus ou moins nettement l'activité enzymatique.

De ces travaux, il convient de dégager l'idée suivante:

Toute augmentation de l'activité d'absorption intestinale tend

à entraîner une hausse de l'enzyme, selon les besoins propres de l'organisme; cette augmentation survient souvent par l'intermédiaire de différents ions dont le Po_4^{---} ou le Ca (NORMAN, B 106 et INESI, B 51).

Localisation (S. POSEN, B 115).

Localisation intracellulaire:

On trouve la phosphatase alcaline en quantité importante:

- dans la surface d'absorption des tubes contournés proximaux, rénaux.
- dans l'épithélium bordant les alvéoles mammaires et les conduits lactifères.
- dans le syntrophoblaste placentaire.
- dans la muqueuse intestinale.

et en quantité moindre dans le sang, le squelette, la rate et le foie (bordure des canalicules biliaires).

Donc, essentiellement, à la proximité des systèmes membranaires directement impliqués dans les échanges.

Localisation extracellulaire:

1. Appareil urinaire: la phosphatase y dérive probablement de débris cellulaires. Ce n'est pas une forme d'excrétion rénale.
2. Excréments: la phosphatase présente dérive directement des villosités intestinales.

Cependant sa migration électrophorétique est différente; ce qui est dû, sans doute, à la présence dans la lumière intestinale de

lipides et polysaccharides, se fixant, en partie, à l'enzyme.

3. Le lait (colostrum): il contient la phosphatase des glandes mammaires.
4. Bile: (cf. canalicules biliaires)
5. Sérum: il s'agit de la phosphatase sérique, non originaire d'un tissu sanguin défini, bien qu'on en dénote dans les leucocytes et lymphocytes (PARK), mais surtout du squelette (SEMB, B 121), du système hépatobiliaire, de l'intestin et éventuellement du placenta.

Caractéristiques des principales phosphatases.

1. Phosphatase du squelette: C'est la plus instable à bas pH; elle est rapidement inactivée par la chaleur, l'urée à basses concentrations et l'E.D.T.A.

Son pH optimum se situe aux environs de 7.

On la trouve surtout dans l'os en cours de croissance (ostéoblastes), où, parallèlement, existe toujours une concentration élevée de sels de phosphate de Ca.

2. Phosphatase des leucocytes: Son taux est élevé dans les cas de mongolisme, bas dans les cas de leucémie de la moelle.
3. Phosphatase intestinale: Elle présente les caractéristiques suivantes:

-Résistance à la Neuraminidase.

-Migration électrique lente avec un point isoélectrique de

l'ordre de 9.4.

- Augmentation après un repas gras.

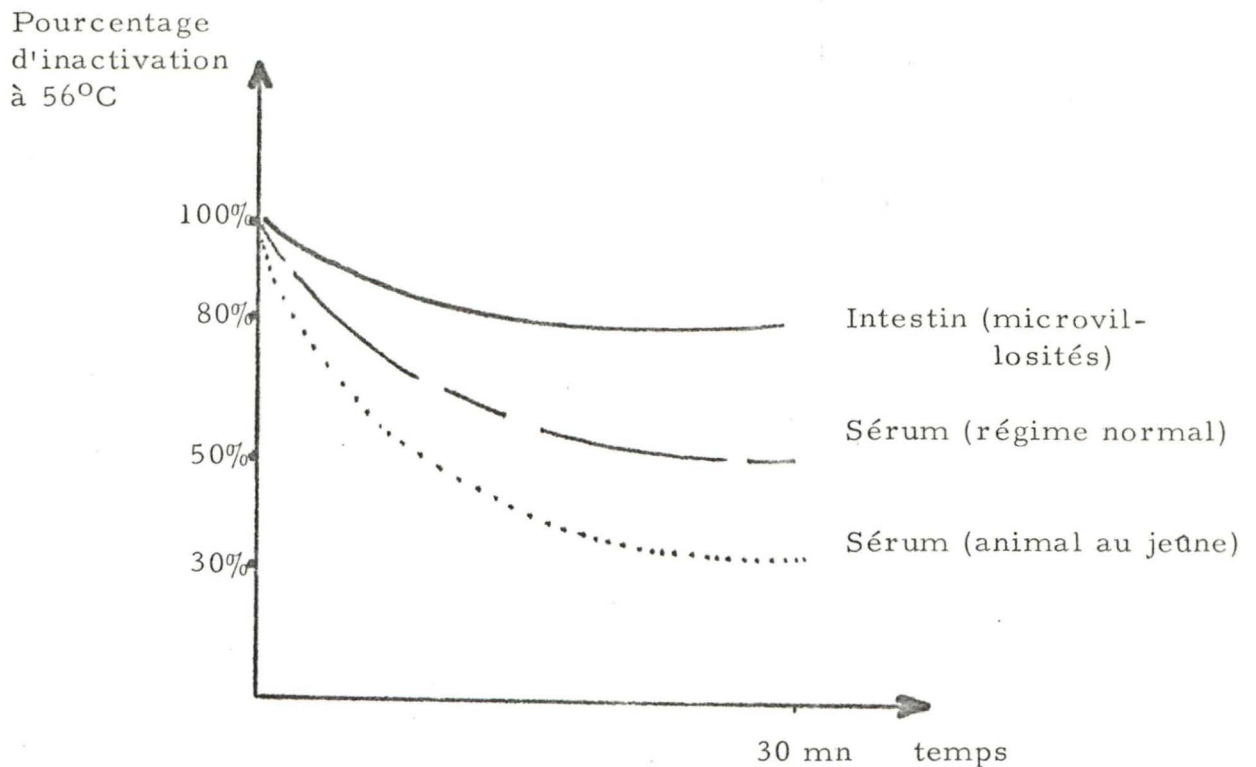
- Inactivation par la L phénylalanine, selon des modalités que nous tenterons d'aborder.

Quant à la phosphatase du sérum maternel, lors de la gestation, son augmentation est due à la phosphatase placentaire.

4. La phosphatase placentaire: Elle résiste facilement aux substances chimiques, à la chaleur et à la neuraminidase, et semble présenter une meilleure affinité pour le Bétaglycérophosphate que pour le phénylphosphate.
5. Phosphatases du sérum: L'activité sérique est très faible; sans doute parce que l'enzyme est présente sous forme exogène, en quantité très variable selon les animaux, le sexe, l'âge, l'état physiologique et nutritionnel, inactive ou masquée par la trop forte teneur protéinique du milieu.

L'isoenzyme la plus étudiée (ISAP) est celle dont l'origine est dite "intestinale" sur les critères suivants:

- faible migration électrophorétique.
- d'autant plus importante après un repas gras.
- inhibition par la L-phénylalanine, surtout chez les animaux nourris.
- résistance à la neuraminidase.
- inactivation thermique du type suivant:



(PARMESH SAINI, POSEN, B 119 bis).

-même type de réponse que la phosphatase du duodénum selon que celui-ci est exposé, ou non, à l'irradiation aux rayons X (HIGHMAN et HANKS, B 47).

Les variations de l'ISAP sont d'ordre pathologique:

- "bile duct obstruction" (KAPLAN, B 59; MOOG, B 16).
- cirrhose et cancer (FISHMAN, B 31, 32 et 102), (STOLBACH, B 132), (NAKAYAMA et al, B 100)

ou d'ordre physiologique: Elle est en effet plus abondante dans les séra de sujets de groupes sanguins B et O, séra les plus susceptibles de variations d'activités selon le régime.

Depuis 1963, on sait que la partie "intestinale" de l'enzyme sérique est en rapport avec les sous-groupes de LEWIS, donc, avec le type sécréteur.

Ainsi, l'I.S.A.P. est moins fréquente chez les individus de groupe $Le(a^+, b^-)$, ne sécrétant pas les substances A, B, H.

Remarque: A, B et H sont trois antigènes mis en évidence dans tous les liquides de l'organisme(dont la salive), et dépendant d'un même couple de gènes(LANGMAN, B 62 bis).

Sur ces bases, les buts que nous nous sommes proposés, se résument à la comparaison, essentiellement biochimique, des variations de l'AlPase sérique et de celles des AlPases d'origine Hépatique et intestinale, en particulier au niveau du système Golgien des cellules de la muqueuse duodénale; lequel réagit au marquage AlPase en Histo chimie.

Nos études se sont alors orientées sur:

- Un dosage, et, à défaut d'une détermination de structure, une approche cinétique de chaque type d'enzyme.
- Une mise en évidence électrophorétique, et, si possible biochimique(par inhibition sélective), de leurs isoenzymes respectives, chez différentes espèces(Homme, rat, souris).
- Et l'enregistrement des modifications engendrées, dans chaque milieu, par des facteurs précis: régimes, équilibres réactionnels, et drogues.

CHAPITRES

I) MATERIEL ET METHODES

A) EXTRAITS TISSULAIRES

Des souris mâles ICR de 3 mois au jeûne depuis 12 h. furent employées; les sangs furent collectés séparément sur héparine (environ 10 unités par ml); celle-ci étant sans effet sur l'activité AlPase (Table 1A). Les séra furent ensuite poolés, dialysés 4 h. contre de l'eau bidistillée, et conservés à -20°C , température à laquelle l'activité des extraits demeure stable (Table 1A).

Les tissus hépatique, duodénal et jéjunal, en poids égaux, furent homogénéisés à 0°C et 2000 t/mn pendant une minute avec un homogénéiseur du type Potter - Elvehjem, dans 5 volumes d'eau glacée bidistillée. L'extraction fut alors poursuivie selon la méthode au butanol, définie par MORTON (B 96):

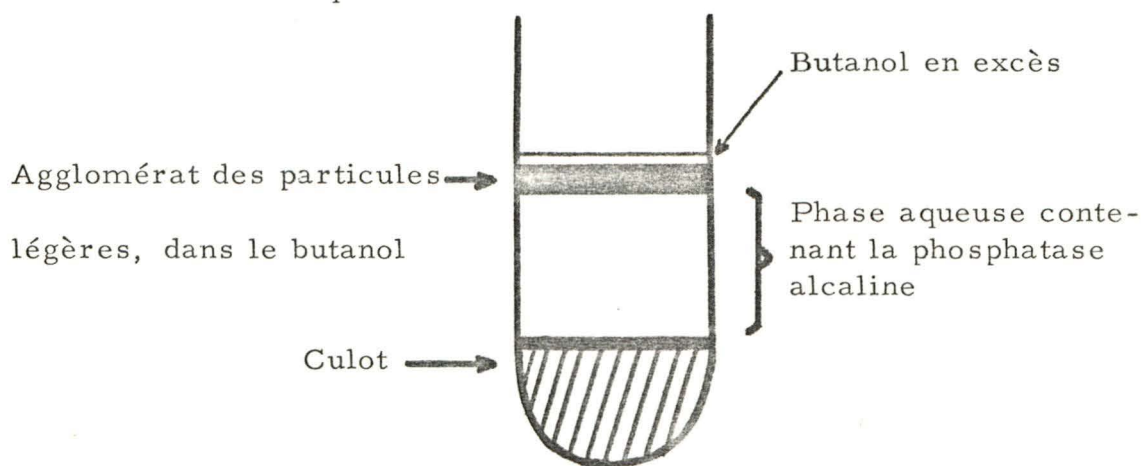
- première centrifugation à 10,000 t/mn (soit 15,000 g à la centrifugeuse IEC) pendant 20 minutes.
- adjonction de n butanol (0.2 ml/ml surnageant).
- puis deuxième centrifugation à 24,000 t/mn (38,000 g) pendant 80 minutes.

Les extraits aqueux furent alors récupérés, dialysés 4 h. contre l'eau, et conservés à -20°C .

Remarques: 1. L'homogénéisation dans l'eau a été préférée à celle dans le sucrose 0,25 M, après qu'il fut démontré que l'activité AlPase hépatique dans le sucrose est

inférieure à celle mesurée dans l'eau, tandis que les 2 milieux conviennent à l'activité intestinale (Table 1A).

2. Le n butanol ne modifie en rien l'activité de la phosphatase -très résistante aux solvants organiques- et possède l'avantage d'extraire en centrifugation toutes les particules ne participant pas au culot, et de relarguer l'enzyme concentrée dans la phase aqueuse.



3. L'indice de la purification obtenue au cours de l'extraction est indiqué dans la table 1B: il est de l'ordre de 13 fois dans le duodenum, et 5 fois dans le foie.

Enfin quelques études annexes furent entreprises:

- sur des séra de patients cancéreux traités au 5 FU (5 Fluorouracyle).
- sur des rats traités au 5 FU pendant 24 et 72 h. et recevant des diètes en caséine totale ou hydrolysée; leurs muqueuses

intestinales furent homogénéisées, comme ci-dessus, dans NaCl 0,1 M, puis centrifugées à 15,000 t/mn (28,000 g) et le surnageant, récupéré, puis dosé extemporanément pour les activités AlPase, Sucrase, et Dipeptidase.

-sur du liquide amniotique récupéré chez des femmes enceintes de 7 à 8 mois.

Dans ce dernier cas, il fut montré qu'aucune activité notable n'était décelable à l'état normal dans le liquide amniotique, sauf lorsque, par une libération de Méconium (consécutive à une hypooxygénation), il était considérablement chargé en AlPase de type intestinal embryonnaire.

B) ETUDES MORPHOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES

Des échantillons de duodénum furent fixés dans l'osmium tamponné (OSO₄ 1% en tampon Phosphate) pendant une heure, ou dans du Glutaraldéhyde (3% en tampon Cacodylate) pendant 30 minutes, ou deux heures.

Après fixation, les spécimens furent déshydratés et enrobés dans l'époue, pour les études morphologiques, ou rincés 4 à 24 heures, pour les études cytochimiques.

Dans ce cas, des sections réalisées au microtome à congélation, de 5 à 30 microns, furent incubées dans les milieux appropriés. L'activité phosphatase acide fut mesurée selon la méthode de BARKA et ANDERSON (B 4); l'activité AlPase, selon celle de HUGON et BORGERS (B 48), et les activités G6 Pase et Thiamine pyrophosphatase, selon

celle de WACHSTEIN-MEISEL (B 143) ou de NOVIKOFF et GOLDFISHER (B 108) modifiée par HUGON, BORGERES et MAESTRACCI (B 50).

En microscopie optique, l'AlPase fut mesurée selon la méthode de BURSTONE (B 12).

C) DOSAGES SPECTROPHOTOMETRIQUES

Ceux-ci furent tous réalisés le même jour sur les extraits enzymatiques, décongelés, et dilués convenablement.

1. Dosage des protéines (500 μ g)

Celui-ci fut réalisé selon la méthode de LOWRY (B 78) par rapport à un standard d'albumine (Courbe I) au Zeiss PM Q II (6 cuvettes). A chaque expérience, toutefois, deux standards (25 et 50 μ g d'albumine) sont étudiés afin de vérifier d'éventuelles variations des valeurs étalons. Cette précaution est valable pour tous les dosages qui suivent.

2. Dosages de l'AlPase

-choix du tampon: Au tampon $\text{NH}_4^+ \text{Cl}^-$, prescrit dans la méthode de NEUMANN (B 105), fut préféré le tampon $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{--}$, qui évitait les risques de chélation des métaux actifs de l'enzyme.

-choix du pH: Celui-ci fut surtout choisi en fonction de l'étude comparative entreprise avec les trois substrats: le paranitrophénylphosphate (PNPP), le phényl phosphate et le Bétaglycérophosphate.

Pour que cette comparaison fût valable, il fallait que chaque

substrat fût présenté à l'enzyme dans les mêmes conditions -au besoin en ne respectant par le pH optimum de chacun.

Ce qui justifia une telle étude, fut la nécessité d'éclaircir les données de F. MOOG (schémas 3A, B et C), selon lesquelles existait un rapport phénylphosphate, dans les villosités intestinales.
bétaglycérophosphate

Mais F. MOOG dosait, dans un cas, le phénol libéré, selon la méthode King-Armstrong (B 60) et dans l'autre, le phosphate, dans un milieu totalement différent (tampon, pH ---). Aussi paraissait-il indispensable de standardiser les méthodes de dosage.

-choix de la concentration de substrat: Celle-ci fut choisie après études cinétiques pour les trois substrats, et sur tous les types de tissus étudiés (Courbes 8, 10, 11 et 12); le problème étant surtout soulevé par le type de courbe cassée (6, 7 et 9) obtenue avec l'extrait intestinal à certains pH; problème que n'avaient pas approfondi d'autres auteurs (dont GHOSH, B 38), parce qu'ils n'avaient pas poussé assez loin l'échantillonnage des concentrations du substrat. Il était alors logique de choisir pour (S) une valeur raisonnable dans la zone correspondant à la plus forte affinité de l'enzyme pour le substrat (Courbe 6).

-technique: Tous les dosages courants furent réalisés dans le tampon carbonate bicarbonate 0,1 M à pH 10, force ionique 0,36, avec 10^{-3} M de magnésium et à une concentration en substrat de 2.10^{-3} M. Le milieu d'incubation consista en 0,5 ml de tampon,

0,5 ml de substrat et 0,5 ml d'extrait enzymatique.

Les échantillons d'intestin furent incubés 5 minutes à 37°, ceux de foie et de sang: 20 minutes.

Dans le cas du PNPP, la réaction fut stoppée par passage en milieu très alcalin (0,5 ml de NaOH 1N) et le PNP libre, mesuré à 410 m μ , comparativement à une courbe étalon (Courbe 2).

Dans le cas du phényl et du Bétaglycérophosphates, la réaction fut stoppée par TCA 50%, et le phosphate inorganique libre, mesuré selon la méthode de DRYER et al (B 24), après élimination, par centrifugation, des protéines précipitées en milieu acide; et ce, comparativement à des étalons de Po_4^{--} (Courbe 3).

Les blancs, pour chaque fraction tissulaire, furent réalisés dans le même milieu où, substrat et NaOH, (respectivement TCA), furent introduits simultanément.

Les activités furent, alors, exprimées en millimicromoles de PNP (respectivement de Po_4^{--}), libérées par minute, par mg de protéine.

Remarques:

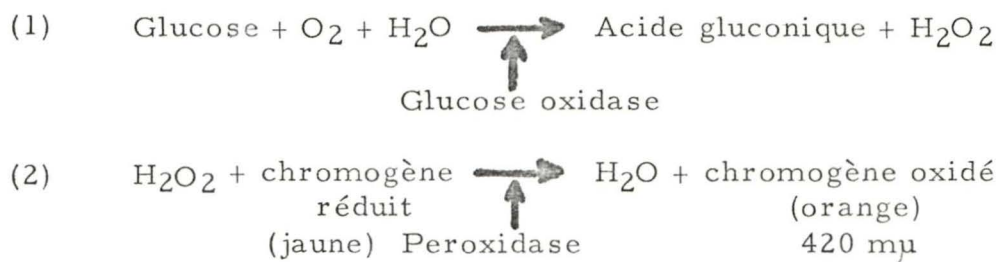
1. Initialement le Po_4^{--} fut révélé par le molybdate, puis d'hydrazine; méthode très sensible, au point qu'elle détectait le phosphate inorganique contenu dans le tampon. On lui préféra donc la méthode à la p. semidine-HCl.
2. Il apparut, ce faisant, qu'il était indispensable de dialyser les extraits enzymatiques, et de vérifier les effets de cette dialyse sur

l'activité au PNPP; parallèlement fut entrepris un dosage avec le phényl phosphate et le Bétaglycérophosphate, et le taux de Pi dans les extraits bruts non dialysés (Tableau 2) fut contrôlé.

3. Dosage de la sucrase

Celle-ci fut dosée dans l'intestin de rat et de souris, selon la méthode de DAHLQUIST (B 20).

La sucrase, principalement située au niveau jéjunal, agit pendant 1 h., à 37°, sur un substrat exogène, le sucrose, (0,056 M) en libérant du glucose dosé, une heure à 37°, selon la méthode colorimétrique au glucostat (WASHKA et RICE, B 145 bis):



Les résultats furent enregistrés en μ moles glucose libéré/mn/mg protéine comparativement à une échelle étalon (Courbe 4).

4. Dosage des dipeptidases

Celles-ci, principalement localisées dans la seconde partie du jéjunum (Tableau 3) furent dosées selon la méthode de I.

JOSEFSSON et T. LINDBERG (B 55, 56, 57), sur des extraits contenant environ 1 mg de protéine par ml, et avec 2 substrats:

le Glycyl-L valine (0,03 M)

et le Glycyl-L leucine (0,0375 M)

le milieu réactionnel comprend; 100 μ l de tampon phosphate 0,15 M

pH 7,4,

; 50 μ l de substrat,

et 25 μ l d'enzyme.

Après 25 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée par 1,3 ml d'éthanol (Ethanol - H₂O : 99 pour 1).

Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation 20 minutes (3,400 rpm) à 0°C; enfin, 1 ml de surnageant est pipeté dans 2 ml H₂O; ce dernier mélange est dosé spectrophotométriquement (220 m μ) en UV, et les DO sont rapportées à deux courbes étalons (Courbe 5), tenant compte de l'absorption parasite de chacun des constituants du milieu, et surtout, de celle des acides aminés libérés par action enzymatique.

D) ELECTROPHORESES ET SCANNING

La méthode initialement suivie fut celle de "disc acrylamide electrophoresis" de I. SMITH (B 125 et 126). 300 microlitres des extraits enzymatiques aqueux, obtenus après la dernière centrifugation, furent récupérés sur 50 microlitres de sucrose 2 M.

Celui-ci tient lieu de vecteur neutre et dense des extraits, favorisant le dépôt des échantillons en immersion, à la surface des colonnes de gel.

Tous les extraits y furent traités sauf les séra, de densité propre suffisante.

1. Choix de tampon:

Le tampon tris-borate exempt de glycine (exerçant un effet inhibiteur sur l'enzyme) fut choisi:

-Tris (45, 5g/l), borate (jusqu'au pH approprié) et TEMED (tétraméthyléthylène diamine = initiateur) pour le gel; le borate étant peu soluble, mais excellent anion.

-Tris-borate, dilué 1 pour 4, pour les cuves à électrophorèse.

Remarque: la méthode étant purement qualitative, les éventuels effets de phosphorylation du tris par l'AlPase ne sont pas à craindre (J. DAYAN, B 21).

2. Choix du pH:

Après essais (Photo 1) il s'avéra que les meilleurs résultats étaient obtenus à pH 9.5, lequel minimise les phénomènes de dispersion.

3. Choix de la concentration du gel:

Nos expériences (Photos 2A et B) nous conduisirent à choisir une concentration de 6%; bien que 8% soit aussi satisfaisant, et que les basses concentrations (4 à 5%) séparent bien les isoenzymes sériques; d'où le mélange:

-1 volume de tris-borate-TEMED (conservé à 0°C).

-1 volume de solution d'acrylamide-bisacrylamide, conservée à 0°C.

(Produits Eastman; respectivement 19 g et 1 g par 100 ml H₂O).

-1 volume de persulfate d'ammonium (accélérateur de polymérisation, préparé extemporanément: 1,02 g par 100 ml H₂O).

4. Type de gel:

Le mélange précédent, après homogénéisation, fut coulé sur 6 cm x 0,8, dans les tubes verticaux en plexiglass de l'appareillage Schoeffel. Ceux-ci étant bouchés à leur extrémité inférieure par du papier dialyse (sans effet postérieur sur l'électrophorèse). Puis, quelques microlitres d'eau furent répandus uniformément à la surface des gels, afin d'en favoriser la polymérisation plane. La durée de cette dernière fut de l'ordre de 15 à 20 minutes à la température ambiante (le froid la ralentissant).

Après vérification, il apparut que les "spacer et sample gels" (à 3% et pH 6.7) n'améliorant pas la séparation -conformément aux données de SMITH, (B 126)- étaient inutiles.

5. Dépôts:

Les tubes furent, alors, placés en chambre froide dans leurs compartiments d'électrophorèse remplis du tampon vecteur tris-borate (à 0°C).

Les dépôts furent réalisés en immersion à la microseringue de précision.

Ils furent de 5 à 20 microlitres pour les extraits intestinaux et de 20 à 80 microlitres pour les extraits hépatiques et sanguins, selon leur nature, et leurs origines (Photos 3 et 4).

6. Voltage et durée de migration:

Les deux sont évidemment indissociables.

En raison des hauts voltages employés, toutes les opérations furent conduites en chambre froide. Les gels bruts, subirent d'abord une "vidange" à 200 volts pendant 15 minutes, afin d'en éliminer les éventuelles impuretés chargées électriquement.

Après essais, le voltage de migration fut fixé d'abord à 150 V., pour favoriser la pénétration régulière des échantillons au cours des 10 premières minutes, au niveau de la cathode; puis à 400 V. pendant une heure, avec un générateur BUCHLER 3 1014A, (soit environ 3 mA par gel).

La position des bandes enzymatiques obtenues, par rapport aux bandes protéiques (du sérum humain) est donnée par le schéma 4.

7. Coloration:

Son but consiste à révéler, de façon spécifique et durable, l'activité AlPase, par un substrat, dont la partie organique soit capable de fixer le colorant sur le gel.

Choix du substrat: Nous savions que le PNPP était utilisable, mais la coloration jaune du PNP était trop labile.

Certains substrats furent essayés avec succès (α naphthyl, ou ASMX, phosphates) qui donnèrent, avec un sel de diazonium (Fast Blue BB), une coloration noirâtre trop imprécise.

Le seul substrat efficace était le Bétanaphthyl phosphate, couplé au Fast Blue BB à pH 9.7 selon une réaction expliquée dans le

schéma 5.

Le complexe violet ainsi obtenu absorbe vers 500 m μ .

Choix du tampon: Celui de SMITH (B 126) (Borate-MgCl₂-KOH) fut adopté.

Technique: Après électrophorèse, chacun des gels, à température ambiante, fut introduit dans un tube à hémolyse rempli du milieu d'incubation suivant:

- Béta naphthyl phosphate et Fast blue BB salt à raison de 50 mg et 25 mg respectivement par 30 ml du tampon précédent préparé et centrifugé extemporanément, les sels de diazonium étant très instables, surtout à la lumière. La durée de l'incubation, à l'obscurité, varia de 40 à 90 minutes selon l'activité des échantillons.

8. Scanning (500 m μ):

Après lavage (24 h.) à l'eau distillée, les gels furent analysés au chromoscan Schoeffel (SD 3000), couplé à l'enregistreur SDC 300. Cependant, aucune activité ne fut calculée à partir des pics ainsi obtenus, en raison de la trop grande hétérogénéité consécutive aux manipulations de coloration.

Remarque: Pour mieux différencier les bandes obtenues par électrophorèse, il eut été intéressant de pouvoir révéler, à même les gels, des affinités sélectives de chacune d'elles pour chacun des deux substrats utilisés (β glycérophosphate et phényl phosphate).

Deux méthodes nous paraissaient possibles:

Celle de HUGON et BORGERS (B 48) utilisée en histochimie et basée sur une précipitation du phosphate libéré par l'activité enzymatique, sous forme de phosphate de plomb; mais le phosphate inorganique ne reste pas fixé au gel.

Celle dérivée de KING et ARMSTRONG (B 60), tendant à fixer par un sel de diazonium le phénol libéré du phényl phosphate. Mais là encore le phénol diffuse très rapidement à travers le gel.

La biochimie, toutefois, réalisée sur des sections de gels parallèlement à des bandes témoins, permet d'apporter quelques précisions à ce sujet (Table 5).

Quant à l'application de l'inhibition par la L phénylalanine (5 mM) à l'électrophorèse, elle fut réalisée ainsi:

les gels, après migration, sont introduits 10 minutes, dans le tampon + la L phénylalanine, rincés rapidement au tampon borate-HCl puis colorés.

Là encore (Photo 5), les résultats ne furent pas satisfaisants, l'acide aminé inhibant à peu près toute forme d'AlPase.

Dans un cas, toutefois, (Photo 4) la troisième bande d'origine dite, "intestinale", semble seule disparaître, dans un sérum (tube 4).

E) INHIBITION A LA L PHENYLALANINE

A chaque variation du taux normal d'AlPase dans un tissu, sous conditions pathologiques (cancer, obstruction des voies biliaires),

ou expérimentales (effets de régimes appropriés, actions de certaines drogues), il était intéressant de tenter d'identifier le type d'isoenzymes concernées, et d'en estimer la proportion.

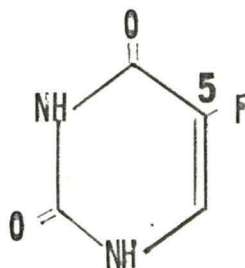
A partir des travaux de KREISHER (B 62) et GHOSH (B 37 et 38), selon lesquels la L phénylalanine tendrait à inhiber, de façon sélective, la phosphatase alcaline de type intestinal, il était possible d'étudier les variations de cette dernière dans le sérum et le foie. Ceci était intéressant de visu - par électrophorèse; mais nous en avons vu les difficultés - ou quantitativement, par la biochimie.

Encore fallait-il connaître le pourcentage d'inhibition qu'il était possible d'atteindre dans nos extraits intestinaux.

F) INJECTIONS DE DROGUES

L'action de deux antimétabolites fut envisagée:

a) le 5 Fluorouracile (5 FU)

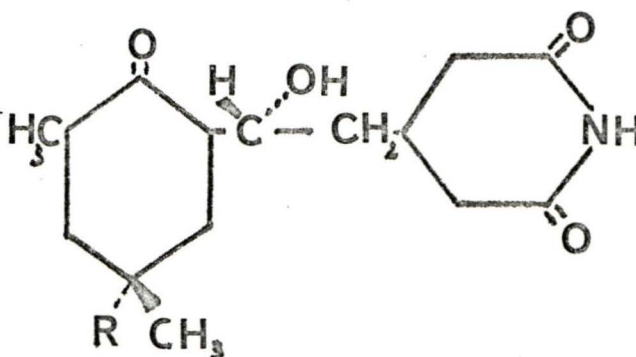


En tant qu'analogue structural de la thymine (méthylée en 5), il est utilisé pour bloquer compétitivement la formation (blocage de la thymidylate synthétase; I.H. KRAKOFF, B 61) et l'incorporation de l'acide thymidylque, dans le DNA, et ralentir, ainsi, sa biosynthèse anarchique dans les cas de tumeurs (E. DESCHNER, M. LIPKIN, B 22). En outre, selon U. STENRAM et M.E. BALIS

(B 130), il bloquerait, ou retarderait, la transformation nucléolaire des précurseurs lourds (45 S) de rRNA en rRNA fonctionnel.

Il faut donc s'attendre, avec ce produit, à des effets lents ou progressifs.

b) Le cycloheximide



interférant au niveau du transfert des AA, par les tRNA, sur les peptides en cours de synthèse.

Il inhiberait l'initiation du peptide et son extension, en bloquant la fixation du tRNA sur son site ribosomique, et diminuerait, parallèlement, la RNA polymérase DNA dépendante; du moins, dans le noyau (OBRIG et al, B 109; MURUMATSU, B 99). Il faut donc s'attendre là, à un blocage plus rapide des synthèses protéiniques.

c) Technique

L'effet du 5 FU fut étudié:

- dans des séra de patients cancéreux traités (I. V.) à des doses de 12 mg/kg (dans 250 ml de 0,9% NaCl) sur une période de deux heures par jour, pendant 6 à 9 jours consécutifs.
- chez une série de 2 x 5 rats (Wistar) ♂ de 400 g, sacrifiés 24 h. après injection de 150 mg (IP), comparativement à 2 x 5 rats témoins; 5 rats de chaque série recevant une diète en caséine totale (Mead Johnson 3200 AU), les 5 autres, une diète en

caséine hydrolysée (Mead Johnson 3200 AS), et ce, pendant une semaine.

L'action du cycloheximide fut étudiée, sur 2 groupes de 20 souris, recevant en I.P. une dose de 40 gamma par g de cet antimétabolite en solution saline.

Le premier groupe fut sacrifié deux heures après une seule injection. Le second, deux heures après une deuxième injection, à 4 heures d'intervalle.

20 souris contrôles recevant les mêmes volumes de saline, furent traitées parallèlement.

Pour la morphologie, le cycloheximide fut employé dans les mêmes conditions à raison d'une seule dose, ou de 7, répétées à 12 heures d'intervalle.

II) RESULTATS

A) REPARTITION BIOCHIMIQUE DE L'ALPASE

Le tableau 2 montre que le maximum d'activité enzymatique est enregistré dans le duodénum et va décroissant le long du tractus intestinal, sauf au niveau de la seconde partie du jéjunum où une légère hausse est observée.

Ces données sont directement reliées à l'importance de la bordure en brosse au niveau duodéal, et sans doute au rôle enzymatique, et d'absorption, importants, de la partie jéjuno-iléale.

Les résultats relatifs au phényl phosphate et au Bétaglycérophosphate, dans les conditions que nous avons définies, révèlent une appréciable différence du rapport décrit par F. MOOG, entre le duodénum (environ 11) et le jéjunum (7); mais ces valeurs ne coïncident pas avec celles données par cet auteur.

B) QUELQUES FACTEURS DE VARIATION DU TAUX D'ALPASE

1. La Race:

Le tableau (6) montre le taux général plus élevé d'AlPase existant chez les souris SWR par opposition aux ICR.

2. Le régime:

Le jeûne tend à diminuer le taux d'AlPase dans l'intestin (Tableaux 1A et 3, 4, comparativement).

Un régime gras (huile de maïs administrée "per os" à des souris SWR et ICR (sacrifiées 2 h. après intubation consécutive

à 12 h. de jeûne) tend, au contraire, à l'augmenter, surtout dans le foie (Tableau 6).

Tous ces résultats sont corroborés par les données antérieures (TUBA, B 136; WARNOCK, B 144; GLICKMAN, B 39) et sont confirmés par électrophorèse: la photo 6 montre, en effet, l'action inductrice du régime gras chez les ICR, qui se traduit par une augmentation nette de l'isoenzyme de type intestinal, dans le foie et le sang (tubes 3 et 4 puis 5 et 6 respectivement).

Enfin des rats et souris, traités à la caséine hydrolysée, ont une activité intestinale, et hépatique, diminuée par rapport à ceux traités à la caséine totale (Tableau 4).

3. L'espèce:

La photo 4 met en évidence les différentes répartitions électrophorétiques pour les séra humain, de rat et de souris.

On y dénote l'importance de l'AlPase sérique d'origine intestinale (notée C) chez le rat (tube 6), comparativement à l'AlPase d'origine "hépatique" (notée A) chez la souris (tube 1) et l'homme (tube 2); chez ce dernier, en outre, peuvent apparaître des bandes d'origine placentaire (notée P dans les tubes 3 et 4).

C) REPARTITIONS ELECTROPHORETIQUES

Les photos 3 et 4 permettent de mettre en évidence quelques caractéristiques des migrations électrophorétiques.

A l'état normal, l'intestin de la souris présente 3 bandes de

R_F nettement différents (tube 1 de la photo 3).

La migration la plus rapide intéresse une bande que F. MOOG qualifie d'IRP ("intermediate ratio AlPase") et que nous codifions par 1.

La migration moyenne revient à la bande la plus importante, celle-là même, où nos tests biochimiques révèlent le plus d'affinité pour le phényl phosphate (Tableau 5), et que F. MOOG qualifie d'HRP ("high ratio AlPase"); elle est codifiée par 2.

Quant à la trainée inférieure proche de l'origine, il est difficile de lui donner une signification précise en dehors du terme "minor slow-moving components" (W. MOSS, B 98); elle est codifiée par 3.

Le même schéma est valable pour le jéjunum (tube 2), où, toutefois, IRP et HRP semblent d'importance égale, bien que les HRP soient, en fait, formées, d'au moins, 2 bandes distinctes (visibles sur les gels à 8% de la photo 3 et codifiées par 1b et 2).

Dans le sérum (photo 3: tube 4 ou photo 4: tube 1), il est difficile de distinguer des bandes nettement séparées; seules tranchent les activités AlPase dites "hépatique et osseuse" codifiées par A et une trainée dite "intestinale" codifiée par C.

Dans le foie (photo 3: tube 3) apparaissent souvent 4 à 5 bandes d'origine, sans doute; hépatique, osseuse, sérique, rénale (hypothétique) et intestinale.

Donc l'intestin présente 3 bandes principales de migration très étirée, alors que les isoenzymes du foie et du sérum tendent, sans doute par leurs faibles différences de charges, à se condenser.

D) CINETIQUES

Celles-ci furent suivies spectrophotométriquement avec les 3 substrats PNPP, phényl et Bétaglycérophosphates à des concentrations variant de $2 \cdot 10^{-2}$ à 10^{-4} M. Les résultats en sont donnés en représentation de LINEWEAVER-BURK (B 74) où l'inverse de la vitesse est porté en fonction de l'inverse de la concentration de substrat.

Remarque: Toute cinétique s'intéressant aux premiers instants d'une réaction enzymatique -lorsqu'a véritablement lieu la fixation du substrat à la molécule enzymatique- des expériences furent réalisées après 1 minute, 5 minutes et 20 minutes sur le duodénum de souris.

Aucune différence dans l'allure des courbes et les constantes ($V_M \cdot K_M$) ne fut observée. Aussi les cinétiques furent-elles toujours bloquées au même temps que celui requis dans les mesures normales d'activités enzymatiques de nos extraits.

La courbe cassée (6) obtenue avec le PNPP dans l'extrait intestinal (Duodénum ou jéjunum), indique probablement deux états dans la molécule enzymatique:

- un état dans lequel l'enzyme a l'affinité maximum pour le substrat (cette affinité s'exprimant en proportion inverse au K_M).
- un état de faible affinité, correspondant à une action, sans doute aspécifique, mais très rapide (V_M maximum) de l'enzyme.

Ce type de représentation dépend du pH:

A des pH supérieurs, (Courbe 9) cet état intermédiaire se

maintient jusqu'au pH 10.3 inhibant presque entièrement l'activité enzymatique (Tableau 9). A des pH inférieurs (Courbe 8) seule une droite, typique du schéma michaélien, est obtenue.

Les mêmes conclusions sont enregistrables avec le Bétaglycéro et le phényl phosphates, où l'étude à pH 10 (Courbe 7) met en évidence l'affinité préférentielle de l'AlPase intestinale pour le phénylphosphate.

Dans le foie, la courbe michaélienne typique est obtenue, si le pH demeure en deça de 10 (Courbes 10A et 11), mais la cassure apparaît aux pH plus basiques (Fig. 10B).

Dans le sang, elle est moins facile à déceler compte tenu de la faible activité qui y est présente; l'aspect michaélien est obtenu dans le domaine des fortes et moyennes concentrations en substrat, dans de bonnes conditions de pH (Courbe 12); mais le K_M (de l'ordre de $5 \cdot 10^{-2}$) traduit une très mauvaise affinité de l'AlPase sérique pour le substrat (PNPP).

Donc nos études cinétiques, peu généralisables pour les extraits hépatiques et sanguins, mettent en évidence dans l'extrait intestinal -à ce stade de purification incomplète- l'existence d'un pH critique (10), au delà duquel la relation de LINEWEAVER et BURK n'obéit plus à la loi michaélienne.

E) ACTION DES ANTIMETABOLITES

1. Cycloheximide:

Les résultats qui vont suivre ont fait l'objet d'une publica-

tion dans Histochemie (B 50 bis) et d'une présentation à Toronto (FCSB; B 14 bis).

a) Résultats morphologiques:

Aux doses employées, les mitoses furent bloquées dans les cryptes de $\frac{1}{2}$ h. à 6 h. après l'injection.

Après une injection, aucune modification nette n'est décelable dans les cellules indifférenciées de la crypte, en particulier, aucune ségrégation nucléolaire.

Dans les cellules absorbantes des villosités, plusieurs citernes golgiennes paraissent moins étendues, mais cette observation n'est pas générale. Pas d'altération, en outre, dans les cellules caliciformes.

Après 7 injections, la structure fine des cellules est altérée. Dans les cryptes, plusieurs corps karyolytiques sont observés dans les cellules souches. Les cellules de PANETH ne montrent pas de grains de sécrétion. Les structures mitochondriales, lysosomiques, réticulum endoplasmiques, et golgiennes, ne sont pas altérées.

Dans les villosités, la modification la plus apparente des cellules absorbantes est la réduction de la zone golgienne (Photos 8A et B). Les citernes golgiennes sont moins nombreuses et la citerne externe présente un rétrécissement fréquent, avec une densification de ses 2 feuillets, et est souvent séparée des autres citernes.

Dans d'autres cas, la zone golgienne est atrophiée, et les 2 extrémités latérales des citernes sont dilatées en des poches contenant des grains lipidiques.

De larges cytolysosomes furent souvent rencontrés (Photo 9); les autres organites de ces cellules demeurent inchangés.

Les cellules caliciformes, dans les villosités, paraissent vidées de leurs granules de sécrétion qu'on ne retrouve plus guère qu'à l'apex de la cellule (Photo 10).

Enfin, dans le foie, le cycloheximide jusqu'à 80 gamma/g, n'entraîne pas de modifications morphologiques importantes, sinon des rapprochements entre mitochondries et réticulum (fléché sur la photo 11A) déjà observés par VERBIN et al (B 14). Il s'agit bien, dans ce cas, du réticulum rugueux, puisqu'aux extrémités des membranes accolées aux mitochondries, subsistent des ribosomes (notés R sur la photo). Par contre de nombreuses inclusions lipidiques sont visibles chez les animaux traités, qui n'existent pas chez les témoins (photo 11B).

Cette observation est à rapprocher des conclusions de JAZCILEVICH et VILLA-TREVINO (B 54), selon lesquelles, la formation des lipoprotéines étant bloquée par le cycloheximide, il y aurait accumulation des triglycérides dès leur arrivée dans les cellules hépatiques, c'est-à-dire au niveau Portal.

b) Résultats cytochimiques:

Activité AlPase (Photos 12, 13, 14 et 15).

Deux heures après une seule injection d'antimétabolite, les sections de muqueuse duodénale, incubées dans le milieu de BURSTONE, présentent une disparition totale de l'activité AlPase dans le Golgi.

Au niveau ultrastructural, aucune réaction ne fut détectable dans les citernes golgiennes. Toutefois, les corps denses et les microvilli sont normalement colorés.

Six heures après injection, une réaction faible et irrégulière fut enregistrée dans les citernes golgiennes.

Après 12 heures l'activité revient à peu près à la normale.

De semblables observations furent faites après 7 injections répétées de cycloheximide; 2 heures après la dernière, aucun précipité de phosphate de plomb n'est présent dans la zone golgienne atrophiée, alors que les corps denses et les microvilli réagissent sans diminution décèlable de l'activité.

Dans le foie à l'état normal, l'activité AlPase n'est décèlable qu'en bordure des canalicules biliaires (Photo 16).

Des études sont en cours pour essayer de vérifier en ultramicroscopie, à quel niveau se produit l'augmentation -si elle a lieu- d'activité AlPase après cycloheximide, observée en biochimie.

Activité AcidPase.

Dans les cellules absorbantes des villosités, un précipité de phosphate de plomb est visible dans les vésicules golgiennes, dans une citerne golgienne et dans les lysosomes, à tous les temps étudiés. C'est donc la répartition classique de cette enzyme.

La plus grande activité est observée dans les vésicules golgiennes des cellules indifférenciées de la crypte, après 7 injections.

Réagissent aussi les corps karyolytiques, particulièrement le long de leur membrane limitante.

Activité TPPase (Thiamine-pyrophosphatasique) (Photo 17).

Aucune modification n'est observée après une injection; les citernes golgiennes sont toujours positives, comme dans les contrôles. La réaction est observable, également, dans les citernes du réticulum endoplasmique des cellules absorbantes villositaires.

Après 7 injections, le précipité est moins abondant dans le Golgi atrophié et, seule, une faible réaction est détectée dans le réticulum endoplasmique.

Activité G 6 Pase (Glucose 6 phosphatase) (Photo 18).

Aucune modification de l'intensité de la réaction n'est observée après une, ou 7 injections, de cycloheximide.

Cette réaction intéresse en priorité tout le réticulum endoplasmique. Donc, de toutes les activités étudiées, seule l'AlPase présente de nettes modifications au cycloheximide.

Ce dernier n'entraîne pas de modifications appréciables de la répartition des autres enzymes étudiées et -pour des doses inférieures à 100 µg/g- pas de bouleversements morphologiques, sauf dans le foie où apparaît une mobilisation des inclusions lipidiques reliée, plus, à des désordres métaboliques, qu'à de réels changements ultrastructuraux.

c) Résultats biochimiques:

Comme indiqué dans le tableau 7 et le schéma 6, la plus grande activité AlPase observée dans le duodénum, est aussi, la plus sensible à l'action du cycloheximide.

A l'état normal, l'activité semble diminuée après la période de 4 h. de jeûne supplémentaire consécutif à la deuxième injection de cycloheximide.

L'action de cet antimétabolite se traduit par une diminution nette et rapide de l'activité AlPase intestinale, surtout dans le duodénum. Par contre, l'activité "hépatique" subit une augmentation significative.

Quant à l'activité sérique, elle semble subir à la fois une diminution de type intestinal, et une augmentation de type hépatique.

d) Résultats électrophorétiques (Courbes 13A et B):

Ceux-ci confirment les précédents, en mettant en évidence une chute de l'intensité de la principale bande (HRP), notée 2, dans le duodénum et le jéjunum.

Toutefois, la bande duodénale, de migration rapide (notée 1), semble augmentée après 1 seule injection de cycloheximide, tandis que la plus lente (notée 3) est diminuée.

Dans le jéjunum, la bande intermédiaire (1b et 2), après cycloheximide, semble plus rapprochée de celle de R_F maximum (1), que chez le témoin.

Dans le sérum, on note une augmentation de l'activité "osseuse, hépatique" (notée A) et une diminution de l'activité "intestinale" (notée C).

Dans le foie, enfin, apparaît une augmentation très nette d'une des principales bandes de haut R_F : non pas celle traditionnellement reconnue comme "hépatique", mais celle de R_F immédiatement inférieur (notée B).

Par conséquent les résultats biochimiques et électrophorétiques traduisent une diminution nette de l'AlPase dans le duodénum après une première injection de cycloheximide, jusqu'à un niveau qui semble se stabiliser.

Le foie, par contre, répond par une nette augmentation d'une de ses isoenzymes de haut R_F (peu importante à l'état normal), et le sang par une hausse passagère de son isoenzyme hé-

patique.

2. 5 FU

Répercussion dans le sérum humain.

a) Action du 5 FU en tant que moyen chimiothérapeutique contre le cancer.

Le but de l'expérimentation était de déceler d'éventuelles modifications de l'activité AlPase sérique après traitement au 5 FU.

Ces études entreprises sur des séra de 8 sujets cancéreux, avant, et après, action du 5 FU (à des intervalles variant entre 24 h. et une semaine) sont résumées dans le tableau 8.

Aucune variation significative de l'activité AlPase n'est enregistrable chez un même patient: en outre les 3 cas (patients 5, 7 et 9), où le 5 FU semble légèrement diminuer l'activité enzymatique, ne peuvent constituer une règle puisque dans d'autres cas (patients no. 6 et 8), l'antimétabolite semble agir de façon contraire.

Par contre, les variations individuelles du taux d'AlPase sont énormes, mais non reliées, semble-t-il, au sexe.

Ces résultats, qui ne sont que partiels, montrent que ce n'est pas au niveau sérique que se situe le principal effet du 5 FU, du moins dans le cadre de l'investigation de l'AlPase.

Les mêmes conclusions sont fournies par la répartition

électrophorétique des patients 1 et 2 (Photo 7A), puis 4 et 8 (Photo 7B); on note l'importance de la bande D ("slow components"), l'augmentation du R_F de la bande principale (A), au fur et à mesure du traitement, et la présence, chez le patient 8, de 2 bandes électrophorétiques, qui peuvent être les bandes A et C ou les bandes hépatique et osseuse séparées.

b) Effets secondaires du 5 FU.

En tant qu'antimétabolite, le 5 FU provoque des effets secondaires importants dont des nécroses intestinales (se traduisant par une chute des protéines); d'où l'emploi de diètes éventuellement protectrices. En particulier l'emploi d'une diète en caséine hydrolysée par rapport à une diète en caséine totale fut préconisé. De premières expériences furent réalisées sur 2 lots de rats traités, une semaine, à chacune de ces diètes, puis au 5 FU pendant 24 ou 72 heures.

Quelques résultats préliminaires (Bounous et al, Can. J. of Surgery; in press) permettaient de croire à une diminution des sucrase et AlPase intestinales et peut être des dipeptidases sous action du 5 FU, chez les rats recevant la diète hydrolysée.

La chute éventuelle des dipeptidases, était évidemment tentante pour expliquer un éventuel effet de réparation de la paroi intestinale (après 5 FU), consécutif à une telle diète.

Des expériences sont en cours pour tenter de vérifier ces données chez la souris et le rat.

D'ores et déjà, il apparaît que la diète hydrolysée administrée, une semaine, à des animaux sains, entraîne une baisse des AlPases hépatique et intestinale, si les animaux subissent le jeûne normal de 12 h. (Tableau 4), mais que, par contre, l'activité dipeptidasique est légèrement augmentée, ceci par rapport à des animaux contrôles recevant, pendant le même temps, la diète totale (Tableaux 3 et 4).

Nos premiers résultats (non publiés) après 5 FU (24 h.) semblent corroborer ces données, avec des activités plus élevées (pour les 2 diètes) que chez les rats non traités à l'antimétabolite; cette observation étant probablement reliée à une baisse nette du taux de protéine, enregistrée dans l'intestin traité à la drogue.

F) MODALITES D'ACTION DE LA L PHENYLALANINE

Souvent employée comme moyen de détecter dans différents tissus, les AlPases d'origine intestinale ou placentaire, la L phénylalanine conduisait souvent, dans nos extraits hépatiques et sanguins, à des résultats irréproductibles voire contradictoires (Tableau 2).

On a vu, en outre, qu'en électrophorèse il n'était pas possible d'atténuer spécifiquement une bande précise, après imprégnation des gels à la L phénylalanine; d'où la nécessité d'essayer d'en définir, expérimentalement, les conditions d'action.

1. Type d'inhibition

Les courbes 8, 10A, 11 et 12 montrent qu'elle est de type incompétitif, conformément aux observations de GHOSH et FISHMAN (B 38).

C'est donc un cas particulier d'inhibition non compétitive, dans lequel, en présence de l'inhibiteur, la représentation de LINEWEAVER-BURK, se traduit par une parallèle à la courbe obtenue sans inhibiteur, parallèle de V_M d'autant plus petit, que la concentration en inhibiteur est plus grande.

2. Influence de la dialyse

Le tableau 2 montre que le pourcentage d'inhibition à la L phénylalanine, n'est pas significativement différent avant, et après dialyse, dans l'intestin, en particulier dans le duodénum. Par contre, les résultats dans le foie et le sang sont totalement différents; d'une part la dialyse semble s'accompagner d'une nette diminution d'activité; d'autre part l'inhibition par l'acide aminé y passe d'environ 40, à quelques pourcents.

Outre l'ion Po_4^{--} , dont on a vu qu'il exerçait une inhibition compétitive, la dialyse peut entraîner une chute de Zn et de Mg. Les Zn essentiels à l'activité enzymatique résistant facilement à une simple dialyse, il était intéressant d'étudier l'effet des ions Mg.

3. Variations selon la concentration de Mg à pH et force ionique, constants (respectivement 10, et 0.36).

La courbe 14 montre qu'à des concentrations croissantes de Mg exogène ajouté au milieu réactionnel des extraits (dialysés), l'activité intestinale normale présente d'abord une légère dépression (maxima vers $1,6 \cdot 10^{-3}$ M), puis atteint rapidement un palier stable.

En présence de L phénylalanine (5 mM), la variation est exactement parallèle.

L'activité hépatique normale, après une forte dépression, va croissant jusqu'à $(Mg) = 2,5 \cdot 10^{-3}$ M, atteint un palier de $2,5$ à $5 \cdot 10^{-3}$ M, puis semble présenter une seconde ascendance, difficilement interprétable en raison des très fortes concentrations en Mg où elle se produit. De même, pour l'activité sérique.

Le Mg semble donc jouer un rôle primordial dans l'activité AlPase de tous nos extraits.

4. Variation selon la force ionique à pH constant (10).

Pour chacun des essais, la force ionique fut calculée selon la formule de NERNST: $I = \frac{\gamma}{2} = \frac{\sum C_n Z_n^2}{2}$

C_n étant la concentration de chacun des n ions du tampon (Na^+ , CO_3^{--} , Mg^{++} )

et Z_n leur charge respective (1 pour Na^+

2 pour CO_3^{--})

La courbe 15A montre que l'activité enzymatique décroît entre $I = 0,1$ et $I = 0,9$ selon une loi quasi logarithmique pour

l'intestin, tandis que l'activité hépatique atteint un palier à $I = 0,1$ (Courbe 15B).

Remarque: Les valeurs de l'activité sérique furent trop faibles pour être enregistrées.

La variation en présence de L phénylalanine (5 mM) dans l'intestin est tout à fait parallèle à celle décrite ci-dessus en l'absence d'inhibiteur, sauf vers les très fortes forces ioniques, sans intérêt dans les études enzymatiques.

Ce n'est donc pas au niveau de la force ionique qu'il faut comprendre le mécanisme de cet acide aminé.

5. Variations selon le pH.

Cette étude fut faite à force ionique et concentration de magnésium constantes, (respectivement 0,115 et $5 \cdot 10^{-3}$ M, compte tenu des résultats précédents). Les courbes 16A et B montrent que l'extrait intestinal suit, en fonction du pH, l'allure en "cloche" traditionnelle.

Vers les bas pH, l'activité semble se stabiliser à un optimum situé entre pH 8,4 et 8,7; et ceci, tant avec le PNPP qu'avec le phényl phosphate ($2 \cdot 10^{-3}$ M) comme substrats. La courbe obtenue en présence de phénylalanine (5 mM) (pour les 2 substrats) montre qu'existe une zone, entre pH 8 et 9,5, où l'inhibition due à l'AA, est maxima. Ces résultats avaient déjà été observés (GHOSH, B 38), dans des conditions expérimentales différentes.

On constate, en outre, qu'après pH 9,5, l'activité enzymatique décroît rapidement.

Ce qui corrobore les observations du tableau 9 et de la courbe 9 montrant, qu'entre pH 10 et pH 10,3, la perte d'activité AlPase varie de 54 à 68% selon la concentration en substrat. C'est dire que la concentration de substrat semble intervenir sur cette perte d'activité, comme elle intervient, apparemment, sur le taux d'inhibition à la L phénylalanine. Le tableau 2 montre, en outre, que le type de substrat lui-même intervient sur les pourcentages d'inhibition, en particulier, dans le jéjunum et le foie; ce qui corrobore les différences d'affinité pour le PNPP, le phényl ou le Béta, selon les tissus.

Cette dernière expérience insiste donc directement sur le rôle du pH dans l'activation et l'inhibition de l'AlPase.

Cependant celle-ci dans les meilleures conditions (I, Mg, tampon, température) ne dépasse jamais 50%.

Dans le foie et le sang, (Courbes 17A et B) la courbe au pH présente l'aspect "en cloche" classique; mais subsiste un palier, aux bas pH, pour lequel l'action de la L phénylalanine est maxima, alors que l'action enzymatique ne l'est pas (pH opt. 9,45 pour le foie et 9,1 pour le sang). En outre, à partir de pH 10, la phénylalanine devient pratiquement inactive. Ce pH n'est donc pas satisfaisant pour les études d'inhibition.

6. Essai d'un milieu à pH 9,20 (optimum pour tous les extraits).

$$I = 0,115$$

($Mg = 5 \cdot 10^{-3}$ M (concentrations saturantes))

Les courbes 8, 11 et 12 montrent qu'intestin, foie et sang présentent une cinétique michaelienne parfaite, mais que l'effet inhibiteur de la L phénylalanine (5 mM), quoique à son optimum (théoriquement), ne dépasse pas 50%, dans l'intestin (52,2% au rapport des V_M) et atteint 15% dans le foie (13% au rapport des V_M) et 30% dans le sang (33% au rapport des V_M).

Donc dans les conditions optima de pH et de concentration ionique, l'effet inhibiteur de la L phénylalanine se révèle plus sensible sur l'AlPase d'origine intestinale, mais n'est, en aucun cas, spécifique de cette enzyme.

III) DISCUSSIONS

A) Généralités

Les résultats relatifs aux électrophorèses, pour une grosseur moyenne des pores (gels de 6 à 8%), mettent en évidence la finesse des séparations sur le support d'acrylamide, bien que des extraits -comme le sérum- possèdent souvent des isoenzymes de taille plus grosse (puisque'elles migrent aussi bien sur gels de 5%), de R_F très proches, ou différents selon les espèces, et variables selon le régime. Se surajoute, pour le sang, la difficulté qu'entraîne la très faible activité AlPase présente, et le risque de masquage par l'énorme quantité des protéines sanguines; ces dernières pouvant s'associer à l'enzyme et modifier, par leurs charges propres, sa migration dans le champ électrique.

Ces difficultés sont également valables en biochimie, où, par surcroît, interviennent les facteurs d'équilibre réactionnels et d'absorption parasite; car à 410 m μ , beaucoup de composés du sérum absorbent, en particulier les traces d'hémoglobine, en dépit de l'emploi de blancs désactivés.

D'où l'impossibilité d'apporter, parfois, des résultats précis dans nos études sur le sérum.

Dans l'intestin, trois bandes, dont deux principales, (1 et 2) apparaissent conformément aux données de MOOG (B 88), de SMITH (B 126), de T. SPENCER (B 127) ou de JOHNSON (B 58). La seconde bande (HRP) semble, même, pouvoir être subdivisée en 2 isoenzymes (1b et 2). Si l'interprétation par MOOG, des bandes 2 et 1, en "high et intermediate

ratio AlPases" recouvre des données biochimiques (B 28 et 29), elles n'en restent pas moins d'origine quasi inconnue. On peut, en effet, expliquer l'existence d'isoenzymes par des différences de charge en acide sialique (SPENCER, B 127) sensible à la neuraminidase; par des différences de taille moléculaire, du moins sur acrylamide, (CHRAMBACH, B 15); ou même par des constitutions différentes en acides aminés (NATORI, B 103), car si on admet le schéma (1) de LAZDUNSKI, ce n'est pas à la partie protéique de l'enzyme qu'est due l'activité, mais à l'engrenage de ses ions métalliques. Par contre, on ne peut identifier chacune des bandes principales, à une affinité sélective pour le phényl (déjà plus réactif que le PNPP) ou le Bétaglycérophosphate; comme semblait vouloir le faire F. MOOG, puisqu'elles réagissent aux deux substrats, qu'elles ne font qu'hydrolyser préférentiellement.

C'est dire qu'il n'est pas exclu qu'existe une affinité spéciale pour un troisième (pyrophosphate; B 13 et 86) ou un quatrième substrat (phosphate de pyridoxale: SRIKANTIAH, B 128 et 129), donc que se révèlent, des formes multiples spécialisées, d'une même activité enzymatique. Ces spécialisations pourraient d'ailleurs être fonction du tissu où l'enzyme est présente, et des substrats potentiels qu'il contient.

D'où la localisation principale de l'AlPase au niveau duodénal, et secondairement au niveau jéuno-iléal, -portions de l'intestin, essentielles à la digestion-, et la présence dans le sang de différents

types d'AlPases, pour la plupart, véhiculées (donc désactivées).

Ces considérations posent, d'emblée, le problème de la régulation des AlPases dont les données les plus récentes sont indiquées dans le schéma 7. Si l'influence des ions Po_4^{--} est directe dans le cas d'un unicellulaire (*E. coli*), elle apparaît, évidemment, moins nettement dans les espèces supérieures, où les besoins de Po_4^{--} sont toujours étroitement liés au métabolisme général, à celui des autres ions en particulier, dans l'intestin d'abord, donc le sang, puis d'autres tissus.

Ainsi une baisse du taux de phosphate libre consécutive à une chute de phosphatase alcaline (PIMSTONE, B 112), entraîne une augmentation de phosphoéthanolamine dans les urines, et une hausse de la calcémie directement reliable à une hausse de l'absorption du calcium au niveau intestinal. Par la glycémie et la calcémie, on peut également comprendre l'influence du jeûne sur le taux d'AlPase.

Plus récemment NORMAN (B 106), et MCGREGOR (B 82), rapportent une augmentation du transport du calcium consécutivement à une injection de vitamine D, parallèle à une augmentation d'AlPase, et d'une "Ca stimulated ATPase". Deux enzymes qui pourraient dépendre d'une même molécule. Si c'est le cas, eut égard au grand nombre d'ATPases à activateurs métalliques (Na^+ , K^+) (PITTS et ASKARI, B 113 et 114; ROBINSON, B 119), le mécanisme de régulation de l'AlPase, esquissé en culture cellulaire (COX et al, B 17, 18 et 43), se complexifie encore davantage.

Toutefois, il est à remarquer que la localisation de l'AlPase est toujours proche des systèmes membranaires, et que toute augmentation pathologique, ou non, de cette enzyme, apparaît, ou bien, à ce niveau, ou bien, par dévoilement d'activité dans des cellules qui à l'état normal n'en présentent pas, de visu, (act. trop diluée); que les facteurs de cette augmentation soient des métabolites (hormones, acides aminés, ions), des antimétabolites (cycloheximide) ou relèvent de fondements pathologiques. Quant aux variations selon la race, elles suggèrent l'intervention éventuelle de facteurs génétiques, tels ceux qui induisent, par exemple, des taux d'ISAP variables, selon le groupe sanguin. Après un régime gras, l'augmentation générale d'AlPase, de type intestinal, suggère, évidemment, une relation avec la digestion duodénale des lipides, lesquels passent dans le sang puis sont métabolisés dans le foie (sauf en présence d'un antimétabolite comme le cycloheximide).

A ce niveau, peut intervenir une autre voie de contrôle, par l'intermédiaire des sucs stomacal, pancréatique ou biliaire.

Si les deux premiers semblent ne pas avoir d'actions particulières, la ligature du canal biliaire par contre (MOOG, B 16 et KAPLAN, B 59) entraîne une diminution de 40% de l'activité duodénale, surtout pour le phénylphosphate, donc une baisse très nette du rapport $\frac{\text{phénylphosphate}}{\text{bétaglycérophosphate}}$, et une augmentation de l'activité AlPase sérique et hépatique.

B) Cinétiques

La Cinétique est difficilement applicable aux extraits sériques en raison de leur faible activité AlPase, donc du temps trop long, nécessaire à une bonne incubation. En outre, dans le domaine des basses concentrations en substrat, les densités optiques deviennent trop imprécises pour permettre, éventuellement, de décèler des ruptures de pente en représentation de LINEWEAVER et BURK.

L'activité AlPase, dans le Foie, est moins sensible que celle de l'intestin aux variations de pH. Aussi n'est-ce qu'aux pH très basiques que la loi Michaelienne n'est plus vérifiée. Toutefois, l'activité enzymatique était, là encore, trop faible pour qu'on pût considérer les vitesses de début de réaction.

Dans l'Intestin, par contre, dès que le pH tend vers les valeurs proches de 10, ou supérieures, une rupture de pente est observable, tant sur des extraits dialysés que non dialysés. Par conséquent, si on admet, qu'à ces pH, existent deux états de la molécule enzymatique, il faut exclure l'hypothèse selon laquelle l'un et l'autre d'entre eux, ou les deux, dépendraient étroitement de la concentration en Phosphate inorganique, ou même, en Magnésium ; C'est, en effet, l'activité enzymatique qui change après dialyse, non l'allure des courbes Cinétiques.

Par ailleurs, les deux parties de courbe ne sont pas significatives de la présence de deux formes d'enzyme qu'on pourrait nommer Béta-Glycéro et Phényl phosphatases, puisqu'à pH inférieur à 10, seule la droite de

type michaélien est obtenue, avec un excellent V_M , alors que les 2 substrats sont, au moins, aussi actifs.

D'autre part, l'AlPase dépendant de l'activateur métallique qu'est le magnésium pourrait, normalement, présenter une activité de saturation (celle qui se traduit par le palier de la courbe 14); c'est dire que la constante de dissociation du complexe enzyme métal pourrait s'obtenir en présence d'une forte concentration en substrat: le complexe EMS (dont on postule que, seul, il donne lieu à la formation des produits de réaction) laissant alors place au complexe E-S.

Mais dans ce cas, la première partie de la courbe cinétique devrait avoir une V_M plus faible que la seconde, et variable après dialyse, ce qui n'est pas le cas.

De même l'inhibition par excès de substrat est exclue puisque, lorsque $1/S$ tend vers 0, la décroissance est parfaitement linéaire, et pas de type hyperbolique.

Reste l'hypothèse selon laquelle la zone de faible affinité représenterait l'enzyme phosphorylée Ep, et la seconde, l'enzyme libre Eo, décrites dans le schéma de LAZDUNSKI (Schéma 2). Dans ce cas, la combinaison Eo-substrat donnerait effectivement le Ks; mais on imagine, alors mal, la raison d'une étape limitante par laquelle devrait passer l'enzyme; car sa phosphorylation sur la sérine, fait partie d'un mécanisme continu et se réalise de façon covalente, non pas par une simple interrélaction, fonction éventuellement, de la concentration en PO_4^{--} du milieu.

Par conséquent c'est, très probablement, au niveau ionique que s'explique la rupture de pente à pH égal ou supérieur à 10, sans doute par des modifications d'équilibre entre l'histidine (sous forme basique), la sérine (sous forme -OH libre) et les ions Po_4^{---} (du substrat) que l'enzyme reconnaît stéréochimiquement.

Les cinétiques comparées de l'extrait intestinal sur le β glycéro et le phényl phosphates (Courbe 7) mettent aussi en évidence ce phénomène de rupture de pente. En outre, les échelles des courbes relatives à chaque substrat étant différentes, le rapport des V_M obtenues (environ 5) donne une interprétation théorique précise du rapport d'activités $\frac{\text{Phényl}}{\text{Béta}}$ décrit par MOOG.

Dans les conditions de dosage que cet auteur avait employées, les chiffres de ce rapport en soi étaient sans signification; seule comptait sa variation sous conditions expérimentales.

En standardisant les dosages nous obtenons aussi des rapports, qui sont évidemment différents de ceux de MOOG, mais dont chacun des chiffres peut être comparé à l'autre; ainsi, ces chiffres ne semblent pas être modifiés par la présence de L phénylalanine (Tableau 2).

Toutefois, aussi différents que puissent être les V_M et les K_M des courbes relatives aux deux substrats, LAZDUNSKI (B 68) ne considère pas leur écart (toujours en deçà d'un facteur 10) comme cinétiquement significatif. Son opinion est que l'AlPase est "substrat non spécifique" et que son seul rôle est d'approvisionner les cellules

en phosphate inorganique, à partir de phosphates organiques qu'elle scinde à la même vitesse.

C) Antimétabolites

1) Cycloheximide

Plusieurs composés affectent des étapes précises de la synthèse des macro molécules dans les cellules (ANDERSON, B 3; HARRIS, B 45; LENAIZ, B 71 et WILLEMS, B 146).

Parmi eux, l'actinomycine (MCKENZIE, B 83; THRELFALL, B 135), la puromycine (LONGNECKER, B 75, 76 et 77 ; NATHANS, B 101), et le cycloheximide (CUMMINS, B 19; HARRIS, B 45; SEREBRO, B 122; SISLER, B 124; TASCA, B 134; YOUNG, B 149), sont les plus couramment employés, en particulier en morphologie et physiologie intestinales. D'importantes altérations sont décelables après injection d'actinomycine (B. DJORDJEVIC, B 23) ou de puromycine, au niveau nucléaire dans les cryptes (REDGRAVE, B 118; GOLDBLATT, B 40; A. le MOIGNE, B 35 et 70).

Par contre, le cycloheximide (NORMAN, B 106) ne provoque pas de nécrose intestinale rapide, si des doses relativement faibles sont employées (HUGON, B 49; VERVIN, B 140 et 141). Le blocage, pendant plusieurs heures, des mitoses n'entraîne pas de dommage apparent dans les cellules, même après plusieurs injections (VERBIN, B 139). En outre, les cellules intestinales sont les seules, semble-t-il à, présenter une activité AlPase visi-

-ble dans le Golgi (HUGON, B 48; NOVIKOFF, B 108), voire dans quelques petites membranes lisses ou citernes, entre ce dernier, et la bordure en brosse. D'où l'idée d'un transport de l'enzyme active vers les microvillosités, via le réticulum lisse.

L'AlPase, comme les autres protéines exportées, est très probablement synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux, fait relai dans le système golgien -où elle subit éventuellement des transformations- puis dérive dans le flot sanguin, ou lymphatique et, en quantité moindre, dans la bordure en brosse où elle est associée à des polysaccharides (MOOG, WENGER, B 89). Par conséquent, la disparition de l'activité AlPase dans le Golgi après 2 heures d'action du cycloheximide semble importante, d'autant que l'activité des autres phosphatases étudiées ne décroît pas si rapidement.

Aspects morphologiques histochimiques et biochimiques.

Nos résultats traduisent donc, apparemment, une rapide inhibition de la synthèse ou du transport de l'AlPase dans les cellules absorbantes du duodénum de souris. D'autres auteurs, étudiant la sensibilité de l'épithélium intestinal au cycloheximide, (ALLEN, B 2; VERBIN, B 139) ont montré qu'à 1.5 mg/kg, ce composé produit un blocage mitotique dans les cryptes en 6 heures environ, sans nécrose particulière, en bloquant, sans doute, les phases S et G₂ du cycle cellulaire.

Aux doses plus massives de 200 µg/g, HARRIS (B 45)

observe des ségrégations nucléolaires, et d'importantes nécroses, dans les cryptes intestinales de rat.

Plusieurs auteurs rapportent des modifications morphologiques dans différents organes après cycloheximide (VRENSEN, B 142).

Dans le cortex surrénalien de rat (DZSINICH, B 25), des systèmes lamellaires concentriques, et des masses compactes, apparaissent dans la zone fasciculée, consécutivement à des désordres enzymatiques.

Dans les cellules parenchymateuses du foie de rat, VERBIN (B 140 et 141) observe, après 1.5 mg/kg de cycloheximide, une nette diminution de synthèse protéique mais peu de changements ultrastructuraux; les citernes golgiennes sont vidées de leur contenu dense, et de fréquentes configurations en "empreinte digitale" sont rencontrées dans le réticulum endoplasmique.

MOOG (B 95), dans son étude de la régulation de l'activité AlPase au cours du développement de la jeune souris (7 jours), observe que le cycloheximide augmente cette activité. Toutefois plus l'âge avance, plus les effets deviennent irréguliers, tour à tour inhibiteurs ou activateurs. Chez les jeunes adultes, elle n'observe aucun effet à une dose de 100 µg/g. Elle en déduit un catabolisme rapide de la drogue chez l'adulte, sans autres précisions.

Pourtant, dans le rein de rat, SHIEBLER et PILGRIM

(B 120) montrèrent que le cycloheximide, à $1.25 \mu\text{g/g}$, produit en 24 h. une diminution importante de l'activité AlPase à tous les stades du développement; l'effet semble donc indépendant de l'âge. GLICKMAN (B 39) montra, chez le rat, que l'augmentation d'AlPase dans la lymphe, détectée après un repas gras, est totalement supprimée après injection de cycloheximide; comme dans nos expériences, la synthèse (ici "de novo") d'AlPase a été immédiatement bloquée.

Par ailleurs, il apparaît peu probable que le transport de l'enzyme soit modifié; c'est en effet tout le pool enzymatique qui tend à se vider après 2 h. de cycloheximide; en outre JAMIESON et PALADE (B 52 et 53) ont montré, dans le pancréas, que la synthèse est nettement dissociée du transport, lequel est inchangé après cycloheximide; les protéines, déjà élaborées, migrent normalement vers la lumière du canal pancréatique.

BENNETT et LEBLOND (B 8) montrèrent même dans l'intestin de rat, que les produits de la membrane cellulaire, élaborés dans le Golgi, atteignent la surface cellulaire en moins d'une heure. Bien sûr, la disparition de l'activité AlPase du Golgi ne signifie pas nécessairement qu'il n'y a aucune synthèse de l'enzyme; en fait, ou bien le cycloheximide, après blocage des synthèses protéiques et épuisement du transport, interdit l'arrivée de toute nouvelle protéine; ou bien, il permet de dévoiler des réserves normalement inactives; ce qui semblerait être le cas dans le

foie, et expliquerait, dans l'intestin, le niveau de stabilisation, non négligeable, que semble atteindre l'AlPase, après 2 injections d'antimétabolite.

A cette dernière possibilité, se rattache l'hypothèse selon laquelle le cycloheximide intervenant, directement, ou indirectement, sur les charges métalliques (Zn), ou ioniques, la conformation, ou la formation de la molécule enzymatique, en empêcherait la réaction de dimère actif.

Toutefois, il semble plus probable d'admettre que les 4 charges de Zn essentielles à l'activité de l'AlPase lui sont fournies au niveau membranaire sur le modèle d'E. coli (LAZDUNSKI, B 65): il est, en outre, difficile d'admettre que la molécule "Golgienne" -du moins celle qui réagit en histochimie- diffère de la molécule "villositaire", par des charges métalliques, dont il est prouvé que l'absence interdit toute activité.

Remarque: Une réponse plus précise sera peut-être apportée par l'isolement du Golgi en centrifugation différentielle.

De même il est illogique d'admettre comme F. MOOG (B 95) que le rapport $\frac{\text{phénylphosphate}}{\text{bétaglycérophosphate}}$ s'explique par la différenciation d'une forme d'AlPase ("phénylphosphatase") plus mûre que l'autre ("bétaglycérophosphatase, d'origine cryptale"); d'une part parce que l'activité "phénylphosphatase" est toujours présente au niveau basal et l'activité "bétaglycérophosphatase", au niveau

apical; d'autre part, parce que la chute rapide d'AlPase après cycloheximide montre que la commande générale de l'enzyme se situe au niveau de toutes les cellules des villosités, non pas uniquement au niveau de la crypte.

Remarque: De semblables conclusions ont été récemment apportées pour la Glucose 6 phosphatase (Thèse Maestracci dans ce laboratoire). Cette chute est bien consécutive à l'action du cycloheximide, et ne s'explique pas uniquement par l'exfoliation continue des cellules, au sommet de la villosité (estimée à moins de 5% en 6 heures (HAGEMANN, B 44); lequel n'est pas le pôle d'activité AlPase maxima puisque ses cellules sont déjà en voie de dégénérescence; ce sont donc les cellules immédiatement inférieures des villosités (en cours d'investigation dans notre laboratoire) qui sont les plus intéressantes et répondent principalement à l'action de l'antimétabolite, et secondairement, à une dégradation membranaire d'ailleurs fortement atténuée, puisque le renouvellement de la membrane lui-même est inhibé (WARREN et GLICK, B 145).

Dans le foie l'accroissement d'AlPase après cycloheximide avait déjà été noté par KAPLAN et RIGHETTI, B 59) qui ne l'avaient pas discuté, puisqu'ils employaient cet antimétabolite, non pas comme drogue, mais pour vérifier la synthèse "de novo" d'AlPases hépatique et sérique, intervenant après 12 heures de "bile duct ligation"; il s'agissait, en fait, de la même isoenzyme

(pH optimum 10,25) située dans les parois cellulaires et les mitochondries du foie, donc là où, habituellement, aucune activité n'est décelable.

Nos expériences démontrent un accroissement très net de l'activité hépatique, avec des doses d'antimétabolite plus élevées, et des temps de sacrifice plus courts, que ceux de KAPLAN.

Cette augmentation d'activité en présence d'un inhibiteur des synthèses protéiniques paraît pour le moins paradoxale; mais il n'est pas exclu qu'intervienne dans ce cas: -ou bien, le dévoilement d'une forme nouvelle, ou modifiée, d'isoenzyme, consécutivement aux désordres métaboliques induits par le cycloheximide; lequel provoque, par exemple, une augmentation des triglycérides hépatiques en interférant dans la formation des lipoprotéines (JAZCILEVICH et VILLA-TREVINO, B 54): -ou bien un accroissement d'efficacité catalytique, ce qui entraînerait -par étude cinétique sur l'enzyme très purifiée- un accroissement de V_M (COX, B 18).

-aspects électrophorétiques:

Les variations particulières obtenues dans les migrations électrophorétiques après cycloheximide (comme après 5 FU) sont d'interprétation difficile; d'autant qu'elles ne subsistent pas toujours après 2 injections, sauf dans le jéjunum, où le rapprochement apparent entre IRP et HRP, semble n'être dû qu'à la séparation des HRP en ses 2 isoenzymes constitutives notées 1b et 2 (Photo

4 et Courbe 13). Les éventuelles modifications des R_F traduisant l'apparition de nouvelles "isoenzymes", ne peuvent être dues qu'à des modifications de charges; mais est-ce par association (d'un ion, d'un résidu aminé ou peptidique), par neutralisation (d'une charge de la molécule enzymatique); par dissociation (d'une partie non enzymatiquement essentielle à la molécule); ou faut-il admettre l'apparition d'une forme d'AlPase n'existant pas à l'état normal?

Seule une étude systématique de ces isoenzymes après isolement (sur DEAE-Sephadex, ou par electrofocusing, B 63) permettrait de répondre à ces questions.

2) 5 FU

Par l'emploi du 5 FU comme méthode chimiothérapeutique on ne vise, évidemment pas, en premier lieu, la diminution d'un taux éventuellement trop élevé d'AlPase; d'autant que cette enzyme - sous diverses formes - n'est présente en grosses quantités, que dans des cas précis de tumeurs ou d'infections (NAKAYAMA, B 100; BARK, B 5; LUST, B 80; FISHMAN, B 32; NATHANSON, B 102).

Nos expériences sur des séra de patients cancéreux, montrent de grosses variations individuelles du taux d'AlPase, reliables soit au type de tumeur, soit aux facteurs individuels (sexe, âge, groupe sanguin).

Si certaines des grosses variations sont dues au type de la tumeur, il convient de noter que les injections I. V. de 5 FU (150 mg/kg) dans les conditions du traitement, sont sans effet, puisqu'aucune règle ne se dégage du tableau 8. D'autres investigations dans ce domaine sont nécessaires.

Plus intéressant semble l'emploi des diètes dites "de protection" dont on recherche les effets réparateurs dans l'intestin, après traitement au 5 FU ou irradiation aux X chez la souris (études en cours).

Si véritablement une diète hydrolysée permet une restauration plus rapide de la muqueuse intestinale, il convient d'essayer d'en connaître le mécanisme, via certaines enzymes cibles, dont les peptidases.

Une chute de celles-ci peut signifier non seulement une baisse d'activité consécutive à un régime prédiété, mais aussi une baisse d'activité catalytique au niveau intestinal. Cependant de gros inconvénients s'attachent à cette méthode, car ces enzymes sont thermolabiles et instables selon les régimes (les protéines jouant un effet protecteur sur les protéases).

F) Action des acides aminés

L'inhibition qu'exerce la L phénylalanine sur l'AlPase n'a jamais été précisée au niveau moléculaire. L'ambiguïté majeure imprégnant les travaux récents (GHOSH et FISHMAN, B 37 et 38)

(V. LUSTIG et J.A. KELLEN, B 81) (FERNLEY, B 30) réside dans l'acceptation - qui semble acquise - que cet acide aminé n'inhibe que l'AlPase de type intestinal; or nos travaux montrent que toute forme d'AlPase est sensible à l'inhibition, et corroborent l'observation de LUSTIG (B 81) selon laquelle tout organe d'espèces différentes possède sa propre réponse, non seulement à la L phénylalanine mais également à la L homoarginine, à la L méthionine, à la L valine et à la L arginine voire à la L leucine (T. NAKAYAMA, B 100). En outre, dès 1948, BODANSKY (B 9) rapportait l'inhibition de l'AlPase par les acides α aminés (glycine; D L alanine, L lysine) l'acide L glutamique, et surtout l'histidine (par son groupement imidazole). Ces observations suggèrent donc qu'il y a des interactions de type stéréochimique (stéréospécificité des formes L, action des chaînes alkylées hydrocarbonées; H.G. SIE et W.H. FISHMAN, B 34), et sans doute ioniques, entre ces acides aminés (Schéma 8), et la molécule d'AlPase. En outre, l'action de la méthionine sous-entend l'intervention d'un atome de soufre, car cet acide aminé, contrairement à la cystéine, possède un S stable, qui passe facilement sous forme minérale en milieu alcalin. Cependant GRIFFIN et COX (B 17) rapportent l'effet de répression de l'AlPase, qu'exercent, en culture de cellules Hela, les acides aminés, et particulièrement la L cystéine (0.1 mM), la L cystine, ou le glutathion:

Les mêmes auteurs font part de travaux montrant que la L cystéine est rapidement accumulée dans les cellules

(30 minutes) au double de la concentration du milieu et agit par ses groupes aminé et sulfhydrile, différemment selon le pH, donc selon son degré d'oxidation.

A pH supérieur à 9.5, le groupe -SH est chargé négativement

le groupe -NH₂ est sous forme NH₂

et le groupe -COOH sous forme COO⁻

Mais ce dernier n'intervenant pas (substitué chimiquement, il ne modifie, en rien, l'inhibition), il y a probablement chélation entre le Zn de l'enzyme et le -SH- et le NH₂ de l'acide aminé (LAZDUNSKI (B 68) donne la même conclusion); c'est dire que l'inhibition est réversible lorsqu'on sature les groupements actifs de l'acide aminé par le Zn et peut-être le Mg; en effet C. BRUNNEL (B 11) étudiant les variations de l'activité de l'AlPase du cerveau de boeuf par la L et la D phénylalanine, suggère que la structure de l'enzyme, sans Mg⁺⁺, est peu propice à la fixation de l'acide aminé, comme elle est peu propice pour produire l'hydrolyse. Un point d'inflexion apparaît à pH 9.2, sur la courbe d'activation de l'AlPase par la D phénylalanine, en fonction du pH; point qui semble bien correspondre au PK d'un groupe ionisable de l'enzyme. Autrement dit la D phénylalanine favoriserait la fixation du Mg⁺⁺ sur l'enzyme, mais seulement en présence de substrat.

Cette dernière éventualité est très hypothétique, et n'explique pas le mécanisme de fixation du Mg⁺⁺ sur l'enzyme. On peut toutefois penser comme SIGEL-GRESSER et MCCORMICK (B 123) que les atomes métalliques forment des complexes avec les groupements imi-

-dazole des histidines reconnues au centre actif de la molécule d'AlPase par LAZDUNSKI (B 68). Les constantes de fixation que calculent ces auteurs permettent d'envisager des complexes avec le Zn (corroboré par SUSO, B 133), le Ni, le Co, le Cu et le Mn.

Toutes considérations qui permettent d'interpréter les résultats que nous avons obtenus:

-en cinétique, lorsque $1/S$ tendant vers zéro, et entre pH 10 et 10.3, (Tableau 9), l'activité enzymatique, normale, ou après L phénylalanine, est modifiée.

-et en faisant varier la concentration de magnésium; ion dont l'absence inhibe, par surcroît, l'activité pyrophosphatasique (fonction du rapport $\frac{Mg^{++}}{PPi}$) de l'AlPase (P.R.U. NAYUDU, B 104).

En outre, elles insistent, non pas sur l'inhibition d'une forme particulière d'AlPase, mais sur les facteurs qui sont à l'origine des interrélations entre AA et toute forme d'AlPase, selon sa provenance, son environnement ionique et physiologique et les conditions expérimentales; ainsi ces interrélations peuvent aussi bien se traduire par une inhibition (telle que décrite par FISHMAN et al), que par une activation (C. BRUNNEL, B 11).

D'où une explication de l'effet, apparemment, activateur de la L phénylalanine mis en évidence par la courbe 9.

Il est, cependant, plus probable, dans ce cas, -la solubilisation de l'AA acidifiant légèrement le tampon (de pH 10.3 à 10.2)- que le

milieu soit devenu plus apte à la réaction, compte tenu de nos courbes de pH; et ce, en dépit de l'effet -d'ailleurs faiblement- inhibiteur de l'AA à ces pH.

Si l'on réajuste le pH, on change la force ionique, dont on a vu (Courbe 15) que l'effet n'était nullement négligeable, quoique sans relation avec l'inhibition; d'où l'abandon de l'étude de cette inhibition à pH 10.

Enfin, on peut expliquer pourquoi, même dans les conditions précises de t^0 , de pH, de force ionique, et de concentration ionique (Po_4^{---} , PPI , Mg^{++}), l'effet inhibiteur de la L phénylalanine dans nos extraits duodénaux reste toujours très inférieur à 70% bien, qu'indubitablement, les 30% restants soient, aussi, d'origine intestinale!

Aussi nous paraît-il prématuré d'employer la L phénylalanine comme moyen de détecter, surtout dans le sang, l'AlPase d'origine intestinale. On ne peut, en effet, accorder directement cette origine au pourcentage inhibé dans nos séra puisque l'AlPase "duodénale" n'est, elle-même, que partiellement inhibée. Il faudrait donc, dans une détermination d'activité sérique, par exemple, tenir compte, comme S. POSEN (B 116), d'une inhibition par la L phénylalanine (5 mM): de 70% des x% d'isoenzyme "osseuse" dans le sang; de 60 à 70% des y% d'isoenzyme "intestinale"; et d'environ 50% des x% d'isoenzyme "hépatique". Ceci, en supposant que chaque isoenzyme étudiée dans son tissu d'origine n'en contienne pas d'autre sensible à l'acide aminé, et que soient connus l'origine et le taux précis de chacune d'elles dans le milieu étudié.

CONCLUSION

De nombreux, mais trop variables résultats, concourent actuellement à remettre en question les théories enzymatiques simples, et en particulier les lois de Michaelis, voire de Kochland, souvent mal vérifiées au fur et à mesure que s'affinent les techniques de dosage et de purification.

Dans le cas de l'AlPase, tel que nous l'avons abordé, il n'était pas question, à priori, de remettre en cause des techniques tenues pour acquises.

Or des problèmes apparemment anodins se posaient constamment:

- rôle physiologique et substrat réels quasi inconnus, tant dans l'intestin que dans les autres tissus.
- existence d'un groupe hétérogène d'enzymes à plusieurs isoenzymes. Donc difficulté de faire de l'AlPase un marqueur génétique.
- difficultés de se débarrasser des effets "parasites" de l'AlPase, lors d'études d'autres enzymes (Acid Pàse, en histochimie).
- irrégularités des réactions sur différents substrats.
- résultats parfois contradictoires selon les conditions opératoires, l'âge, la race et le sexe des animaux traités, et les expériences d'activation ou d'inhibition.

D'autre part, des augmentations anormales de cette enzyme ne sont jamais accompagnées d'augmentations parallèles d'enzymes dif-

-férentes, sauf, à un état moindre, pour des molécules plus ou moins impliquées dans le transport ou la scission du Po_4^{---} , en relation avec d'autres ions (Ca^{++} , K^+ , Na^+).

Enfin la phosphatase est toujours présente, voire d'une façon amplifiée, lors du développement ontogénique (MOOG, B 90, 91, 92, 95; WILLIAMS, B 147), dans les cas de développement anarchique ou, chaque fois que se font sentir des besoins d'échanges, à proximité des systèmes membranaires cellulaires.

Toutes observations qui nous conduisirent à des études d'orientation à la fois structurale et pathologique sur des extraits, toutefois, qui ne sont que partiellement purifiés.

Pourtant sur des milieux infiniment plus purifiés (sur DEAE cellulose et sephadex), MOOG (B 27 et 28) et d'autres auteurs n'ont pu isoler d'AlPase spécifique du phénylphosphate par exemple, ou déterminer d'autres bandes électrophorétiques que celles que nous avons obtenues. Le problème majeur réside donc à deux niveaux:

1. Est-il possible que l'AlPase des organismes supérieurs présente les mêmes caractéristiques de formation et de régulation que l'AlPase d'E. coli.

Face à cette éventualité beaucoup d'objections se dressent. Car - d'une part, l'enzyme est indépendante du taux de Pi , en culture de tissu (fibroblastique: MARTIN-COX, B 17), mais compétitivement inhibée in vitro, ou en culture bactérienne (AlPase répressible chez E. coli).

- D'autre part, l'environnement physiologique et

chimique des phosphatases suppose des interactions différentes selon leur localisation, la fonction des organes qui les abritent, et les facteurs individuels en particulier génétiques; ainsi, le taux de leucocyte AlPase varie de façon significative dans les cellules dérivées de patients affligés de compléments chromosomiques anormaux (trisomie du 21 = mongolisme), alors qu'elle est diminuée dans certaines leucémies myéloïdes (délétion de tout, ou partie, du 21). De semblables conclusions peuvent être apportées expérimentalement par l'action du 5 BUdR (LEVINE, MARTIN et COX, B 17).

Remarque: 5 BUdR = 5 Bromodeoxyuridine (analogue de la thymidine); reste à montrer si l'action du 5 FU que nous avons entrevue, répond au même mécanisme: inhibition de contact et synthèse de DNA annulées.

. action au niveau de la phase S.

. marquage (au tritium) dans de longs segments des chromosomes 2, 3, 17 et de ceux présumées être les 14, 19 et 22.

Enfin, même au sein d'un organe donné, il n'a pas encore été possible de trouver un schéma de régulation précis; ainsi la "bile duct obstruction" (MOOG, B 16 et KAPLAN, B 59) entraîne théoriquement au niveau duodénal une perte du pouvoir émulsifiant que la bile exerce sur les graisses mais pas une diminution d'absorption de ces dernières, puisqu'elles ne sont absorbées qu'au niveau jéjuno-iléal.

Peut-être est-ce donc un composant de la bile -à définir- qui influence, et le caractère, et le niveau de l'AlPase intestinale,

selon le régime (gras ou riche en AA), ou les drogues (cycloheximide, 5 FU); mais ce n'est en aucun cas le seul facteur puisque le gradient

Phényl décrit par MOOG, existe déjà avant le débouché du canal bi-Béta

-liaire dans le duodénum, et que des molécules apparemment sans rapport (corticoides, vitamine D) donnent des résultats globaux identiques, se traduisant, ou bien, par une synthèse de novo (NORHAN, B 106), ou bien, par efficacité catalytique accrue (COX, B 18). D'où l'idée que nous tentons d'aborder, d'un facteur intrinsèque; lequel pourrait être:

-ou bien le taux de métaux essentiels à la charge enzymatique de l'AlPase, puis à son activité maxima.

-ou bien la norme d'approvisionnement des cellules en Po_4^{--} , avec existence d'un "feed back" faisant intervenir le niveau, mais non la qualité, des substrats, et les enzymes plus ou moins impliquées dans le renouvellement du génôme (AtPase), ou dans des étapes métaboliques précises (phosphorylases avec médiation de l'AMP cyclique, et des hormones).

2. Dans quelle mesure faut-il admettre que l'AlPase est la première d'une série d'enzymes à agir, non pas par un centre actif classique de type protéique, mais (schéma de LAZDUNSKI), selon un centre métallique?

C'est dire, alors que les différences, toujours minimales, d'affinité, pour les substrats artificiels étudiés, ne sont que des différen-

-ces d'environnement ou de liaisons métalliques, et que la régulation des AlPases n'est qu'une fonction de charges précises; ce qui n'exclut pas l'influence des changements métaboliques (besoins de l'âge et du sexe) ou fonctionnels (augmentation de la surface et de la fragilité membranaires des villosités, mais non de leur volume au deuxième stade de développement des souris (MOOG, B 88) (OVERTON, B 110; MELNYKOVICH, B 87). Autant de changements qui peuvent avoir des causes hormonales car la prednisolone, par exemple, entraîne une diminution de la multiplication, et une augmentation de la taille des cellules, parallèlement à une augmentation d'AlPase. Enfin l'AlPase peut même avoir pour substrats des hormones phosphorylées (V. BOTTE, B 10).

Toujours est-il que l'activité AlPase semble ne pas être liée à une molécule déterminée et stable, mais à un support minimum, plus ou moins dépendant d'associations protéiniques (d'où le masquage des AlPases sériques, et l'existence d'isoenzymes, voire de liens avec d'autres enzymes comme l'AtPase), ioniques (Po_4^{--} , PPi , Mg^{++} , Zn^{++} , COO^- , Na^+ , radicaux alkyles ...) ou hormonales. Quant à l'ensemble des molécules d'AlPase, il semble répondre au schéma de synthèse ergastoplasme - Golgi - structure membranaire, sans centre directeur particulier, et possède un turnover dans les cellules absorbantes (mis en évidence par l'étude de l'action du cycloheximide), bien plus rapide qu'on ne le supposait auparavant.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMBLER, J., GREEN, A.G. and PULVERTAFT, C.N.

A study of total serum AlPase activity in men, following partial gastrectomy.

GUT 11, 255-257, 1970.

2. ALLEN, C., GIBBS, P.L. and JERSILD, R.

Intestinal fat transport during inhibition of protein synthesis.

An E.M. study.

Exp. Mol. Path. 14, 90-102, 1971.

3. ANDERSON, L.L., COLLINS, G.J., OJIMA, Y. and SULLIVAN,

R.D.

A study of the distribution of methotrexate in human tissues and tumors.

Cancer Res. 30, 1344-1348, 1970.

4. BARKA, T. and ANDERSON, P.

Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler.

J. Histochem. Cytochem. 10, 741-753, 1962.

5. BARK, C.J.

Actefactual elevations of serum AlPase following albumin infusions.

Amer. J. Clin. Path. 52, 466-467, 1969.

6. BECKMAN, L. et G. and DAHGREN, S.

Isozyme variation of serum AlPase and naphthyl amidase in biliary and gastrointestinal disease.

Scand. J. Gastroent. 3, 241-245, 1968.

7. BENNETT, G.

Migration of glycoprotein from golgi apparatus to cell coat in columnar cells of the duodenal epithelium.

J. Cell. Biol. 45, 668-673, 1970.

8. BENNETT, G. and LEBLOND, C.P.

Formation of cell coat material for the whole surface of columnar cells in the rat small intestine as visualized by radioautography with L-Fucose-³H.

J. Cell. Biol. 46, 409-416, 1970.

9. BODANSKY, O.

The inhibitory effects of L Alanine, L glutamic acid, L lysine and L histidine on the activity of intestinal, bone, and kidney phosphatases.

J. Biol. Chem. 174, 463-476, 1948.

10. BOTTE, V.

The hydrocortisone 21 phosphate as substrate for AlPase.

Histochemie 16, 195-197, 1968.

11. BRUNNELL, C. and CATHALA, G.

AlPase du cerveau de boeuf; rôle du magnésium sur l'action de la L Phénylalanine et d'autres acides aminés.

Biochim. Biophys. Acta 235, 106-118, 1971.

12. BURNSTONE, M.S.

Enzyme histochemistry.

Academic Press, N.Y. and London, 1962.

13. BUTTERWORTH, P.J.

The pyrophosphatase activity of pig kidney AlPase and its inhibition by Mg ions and excess of PPi.

Biochem. J. 110, 671-675, 1968.

14. CANAPA-ANSON, R. and ROWE, D.J.F.

Electrophoretic separation of tissue specific serum AlPases.

J. Clin. Path. 23, 499-508, 1970.

14. CHARUEL, C.

bis.

Cycloheximide sensitivity of the AlPase activity in the intestine, liver and blood of adult mice.

Canadian Federation of Biological Societies, 14, 85, 1971.

15. CHRAMBACH, A. and RODBARD, D.

Polyacrylamide Gel electrophoresis.

Science, 172, 440-451, 1971.

16. COOK, R. and MOOG, F.

Influence of biliary stasis on AlPase in the small intestine

Biochim. Biophys. Acta 215, 220-223, 1970.

17. COX, R.P., GILBERT, P. and GRIFFIN, M.J.

Alkaline inorganic pyrophosphatase activity of mammalian cell AlPase.

Biochem. J. 105, 155-161, 1967.

18. COX, R.P., ELSON, N.A., TU, S.H. and GRIFFIN, M.J.

Hormonal induction of AlPase activity by an increase in catalytic efficiency of the enzyme.

J. Mol. Biol. 58, 197-215, 1971.

19. CUMMINS, J.E., BLOMQUIST, J.C. and RUSCH, H.P.

Anaphase delay after inhibition of protein synthesis between late prophase and prometaphase.

Science, 154, 1343-1344, 1966.

20. DAHLQUIST, A.

Essay of intestinal disaccharidases.

Anal. Biochem. 22, 99-107, 1968.

21. DAYAN, J. and WILSON, I.B.

The phosphorylation of tris by AlPase

Biochim. Biophys. Acta 81, 620-623, 1964.

22. DESCHNER, E. and LIPKIN, M.

Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells in relation to therapy.

Med. Clin. North America 55, 601-612, 1971.

23. DJORDJEVIC, B. and KIM, J.H.

Different lethal effects of mitomycin C and actinomycin D during the division cycle of hela cells.

J. Cell. Biol. 38, 477-482, 1968.

24. DRYER, R.L., TAMMES, A.R. and ROUTH, J.I.

The determination of phosphorus and phosphatase with N-phenyl-p-phenylene diamine.

J. Biol. Chem. 225, 177-183, 1957.

25. DZSINICH, C.S., SZABO, D. and OKROS, I.

Cycloheximide-induced ultrastructural changes in the adrenal cortex of the rat.

Experientia 25, 835-839, 1969.

26. ELFENBEIN, I.

Effects of cycloheximide on hydroxyurea-induced necrosis in crypts of the small intestine of mice.

Fed. Proc. 28, 519 (16 11A), 1969.

27. ENGSTROM, L.

Studies on calf intestinal AlPase.

Parts I et II.

Biochim. Biophys. Acta 52, 36-59, 1961.

28. ETZLER, M.E. and MOOG, F.

Immunological characterization of AlPase isoenzymes of the mouse duodenum.

Biochim. Biophys. Acta 154, 151-161, 1968a.

29. ETZLER, M.E., BIRKENMEIER, E.H. and MOOG, F.

Localization of AlPase isozymes in mouse duodenum by immunofluorescence microscopy.

Histochemie 20, 99-104, 1969.

30. FERNLEY, H.N. and WALKER, P.G.

Inhibition of AlPase by L phenylalanine.

Biochem. J. 116, 543-544, 1970.

31. FISHMAN, W.H.

The phosphohydrolases; their biology, biochemistry and clinical enzymology.

Ann. N.Y. Ac. Sci. 166, 365-819, 1969.

32. FISHMAN, W.H., INGLIS, N.I., STOLBACH, C.L. and KRANT, M.J.

A serum AlPase isoenzyme of human neoplastic cell origin.

Cancer Res. 28, 150-154, 1968.

33. FISHMAN, W.H., GREEN, S. and INGLIS, N.I.

Organ specific behavior exhibited by rat intestine and liver AlPase.

Biochim. Biophys. Acta 62, 363-375, 1962.

34. FISHMAN, W.H. and SIE, H.G.

L-homoarginine; an inhibitor of serum "bone and liver" AlPase.

Clin. Chim. Acta 29, 339-341, 1970.

35. GABRIEL, A. et MOIGNE, A.L.

Action de l'actinomycine D sur la différenciation cellulaire au cours de la régénération des planaires qui viennent d'éclore.

I. Etudes morphologiques histologiques et ultrastructurales du pouvoir de régénération en présence de l'antibiotique.

Z. Zellforsch. 115, 426-441, 1971.

36. GHOSH, N.K.

Purification and molecular properties of placental and intestinal AlPases.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 166, 604-640, 1969.

37. GHOSH, N.K. and FISHMAN, W.H.

L Phenyl Alanine inhibition of rat intestinal AlPase; a homosteric phenomenon.

Arch. Biochem. Biophys. 126, 700-706, 1968.

38. GHOSH, N.K. and FISHMAN, W.H.

On the mechanism of inhibition of intestinal AlPase by L phenylalanine. I. Kinetic studies.

J. Biol. Chem. 241, 2516-2522, 1966.

39. GLICKMAN, R.M., ALPERS, D.H., DRUMMEY, G.D. and ISSELBACHER, K.J.

Increased lymph AlPase after fat feeding. Effects of medium chain triglycerides and inhibition of protein synthesis.

Biochim. Biophys. Acta 201, 226-235, 1970.

40. GOLDBLATT, P.J., VERBIN, R.S. and SULLIVAN, R.J.

Induction of nucleolar segregation by actinomycin D following inhibition of protein synthesis with cycloheximide.

Exp. Cell. Res. 63, 117-123, 1970.

41. GOMORI, G.

The complex nature of AlPase.

Biochim. Biophys. Acta 8, 162-172, 1952.

42. GOTTLIEB, A.J. and SUSSMAN, H.H.

Human placental AlPase, molecular weight and subunit structure.

Biochim. Biophys. Acta 160, 167-171, 1968.

43. GRIFFIN, M.J. and COX, R.P.

Studies on the mechanism of hormonal induction of AlPase in cell cultures:

II. Rate of enzyme synthesis and properties of base level and induced enzymes.

Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 946-953, 1966.

44. HAGEMANN, R.F., SIGDESTAD, C.P. and LESHER, S.

Quantitation of intestinal villus cells on a weight basis; values for C57 BL/6, mice.

Am. J. Physiol. 218, 637-640, 1970.

45. HARRIS, C., GRADY, H. and SVOBODA, D.

Alteration in pancreatic and hepatic ultrastructure following acute cycloheximide intoxication.

J. Ultrastructure Res. 22, 240-251, 1968.

46. HARRIS, C., GRADY, H. and SVOBODA, D.

Segregation of the nucleolus produced by anthramycin.

Cancer Res. 28, 81-90, 1968.

47. HIGHMAN, B. and HANKS, A.R.

Serum intestinal AlPase in rats after 800 R whole body or regional X irradiation.

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 133, 1201-1206, 1970.

48. HUGON, J.S. and BORGERS, M.

Ultrastructural localization of AlPase activity in the absorbing cells of the duodenum of mouse.

J. Histochem. Cytochem. 16, 629-640, 1966.

49. HUGON, J.S. et MAESTRACCI, D.

Etude cytochimique ultrastructurale de l'action du cycloheximide sur la muqueuse duodénale de la souris.

7e Congrès Int. de Microsc. Elect., Grenoble, 477-478, 1970.

50. HUGON, J.S., BORGERS, M. and MAESTRACCI, D.

Glucose-6-phosphatase and thiamine pyrophosphatase activities in the jejunal epithelium of the mouse.

J. Histochem. Cytochem. 18, 361-369, 1970.

50. HUGON, J.S. and CHARUEL, C.
bis

Mouse intestinal sensitivity to cycloheximide. A morphological, cytochemical and biochemical study.

Histochemie 27, 50-62, 1971.

51. INESI, G.

P. nitrophenyl phosphate hydrolysis and Ca Ion transport in fragmented sarcoplasmic reticulum.

Science 171, 901-903, 1971.

52. JAMIESON, J.D. and PALADE, G.E.

Intracellular transport of secretory protein in the pancreatic exocrine cell. 3. Dissociation of intracellular transport from protein synthesis.

J. Cell. Biol. 39, 580-588, 1968.

53. JAMIESON, J.D. and PALADE, G.E.

Intracellular transport of secretory protein in the pancreatic exocrine cell.

4. Metabolic requirements.

J. Cell. Biol. 39, 589-603, 1968.

54. JAZCILEVICH, S. and VILLA-TREVINO, S.

Induction of fatty liver in the rat after cycloheximide administration.

Lab. Invest. 23, 590-594, 1970.

55. JOSEFSON, L. and LINDBERG, T.

Intestinal dipeptidases. Part I: Spectrophotometric determination and characterization of dipeptidase activity in pig intestinal mucosa.

Biochim. Biophys. Acta 105, 149-161, 1965.

56. JOSEFSON, L. and LINDBERG, T.

Intestinal dipeptidases, Part III: Characterization and determination of dipeptidase activity in adult rat intestinal mucosa.

Acta Physiol. Scand. 66, 410-418, 1966.

57. JOSEFSON, L. and LINDBERG, T.

Intestinal dipeptidases, Part IX: Studies on dipeptidases of human intestinal mucosa.

Acta Chem. Scand. 21, 1965-1966, 1967.

58. JOHNSON, F.R. and KUGLER, J.H.

The distribution of AlPase in the mucosal cells of the small intestine of the rat, cat and dog.

J. of Anatomy 87, 247-256, 1953.

59. KAPLAN, M.M. and RIGHETTI, A.

Induction of rat liver AlPase; the mechanism of serum elevation in bile duct obstruction.

J. Clin. Invest. 49, 508-516, 1970.

60. KING, E.J. and ARMSTRONG, A.R.

Phosphatase activity.

Can. Med. Assoc. J., 31, 376-379, 1934.

61. KRAKOFF, I.H.

The present status of cancer chemotherapy.

Medical Clinics of North America 55, 683-701, 1971.

62. KREISHER, J.H., CLOSE, V.A., FISHMAN, W.H.

Identification by means of L phenylalanine inhibition of intestinal AlPase components, separated by starch gel electrophoresis of serum.

Clin. Chim. Acta 11, 122-127, 1965.

62. LANGMAN, M.J.S., LEVTHOLD, E., ROBSON, E.B., HARRIS, bis

J., LUFFMAN, J.E. and HARRIS, H.

Influence of diet on the "intestinal" component of serum AlPase in people of different ABO blood groups and secretor status.

Nature 212, 41-44, 1966.

63. LATNER, A.L., PARSONS, M. and SKILLEN, A.W.

Isoelectric focusing of AlPase from human kidney and calf intestine.

Enzymologia 40, 1, 1-7, 1971.

64. LAWRIE, N.R. and YUDKIN, J.

Studies in biochemical adaptation: Effect of diet on the intestinal AlPase of the rat.

J. Biochem. 45, 438-440, 1949.

65. LAZDUNSKI, C., CHAPPELET, D., PETITCLERC, C.,
LETERRIER, F., DOUZOU, P. and LAZDUNSKI, M.

The Cu^{++} AlPase of E. coli.

Eur. J. Biochem. 17, 239-245, 1970.

66. LAZDUNSKI, C., PETITCLERC, C. and LAZDUNSKI, M.

Structure-function relationships for some metallo-alkaline phosphatases of E. coli.

Eur. J. Biochem. 8, 510-517, 1969.

67. LAZDUNSKI, M. and OUELLET, L.

AlPase intestinale; cinétique de l'hydrolyse du phosphate de p. Nitrophenyle.

Can. J. Chem. 39, 1298-1308, 1961.

68. LAZDUNSKI, M. and OUELLET, L.

I. Préparation d'une AlPase purifiée.

Can. J. Biochem. Physiol. 39, 1933-1937, 1961.

II. Inhibition de l'AlPase intestinale.

Can. J. Biochem. Physiol. 40, 1619-1624, 1962.

69. LAZDUNSKI, M., PETITCLERC, C., CHAPPELET, D. and
LAZDUNSKI, C.

A model: the AlPase of E. coli.

Eur. J. Biochem. 20, 117-132, 1971.

70. LE MOIGNE, A. et GABRIEL, A.

Action de l'actinomycine D sur la différenciation cellulaire au cours de la régénération de planaires qui viennent d'éclore.

II. Etudes autoradiographiques, histologiques et ultra-structurales de l'action de l'antibiotique sur les synthèses d'ARN.

Z. Zellforsch. 115, 442-460, 1971.

71. LENAZ, L., STERNBERG, S.S. and PHILIPS, F.S.

Cytotoxic effects of L-D-Arabinofuranosyl-5-fluorocytosine and L-D-Arabinofuranosyl cytosine in proliferating tissues in mice.

Cancer Res. 29, 1790-1798, 1969.

72. LEROUX, M. and PERRY, W.F.

Serum heat stable AlPase in pregnancy.

Amer. J. Obstet. Gynec. 108, 235-239, 1970.

73. LIEBERMAN, M.W., VERBIN, R.S., LANDRY, M., LIANG, H., FARBER, E., LEE, T. and STARR, R.

A probable role for protein synthesis in intestinal epithelial cells damage induced in vivo by cytosine arabinoside, nitrogen mustard, or X irradiation.

Cancer Res. 30, 942-951, 1970.

74. LINEWEAVER, H. and BURK, D.J.

J. Am. Chem. Soc. 56, 658-1934.

75. LONGNECKER, D.S.

Organ distribution of puromycin in rats.

Lab. Invest. 22, 400-403, 1970.

76. LONGNECKER, D.S. and FARBER, E.
Acute pancreatic necrosis induced by puromycin.
Int. Acad. Pathol. 16, 321-329, 1967.
77. LONGNECKER, D.S., SHINOZUKA, H. and FARBER, E.
Molecular pathology of in vivo inhibition of protein synthesis.
Amer. J. Pathol. 52, 891-915, 1968.
78. LOWRY, D.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.
79. LUECKE
Zn deficiency in the rat; effect on serum and intestinal AlPase activities.
J. Nutrition 94, 344-349, 1968.
80. LUST, G. and BEISEL, W.R.
Alterations of AlPase in mouse tissues after experimental infection.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124, 812-816, 1967.
81. LUSTIG, V. and KELLEN, J.A.
Species, organ and subcellular specificity of AlPase as determined by Amino acid inhibition studies.
Comp. Biochem. Physiol. 39B, 305-310, 1971.
82. MCGREGOR, R., HAMILTON, J.W. and COHN, D.V.
The induction of Ca binding protein biosynthesis in intestine by vitamine D₃.
Biochim. Biophys. Acta 222, 482-490, 1970.

83. MCKENZIE, J.M., ADIGA, P.R. and MURTHY, P.U.N.
Effects of actinomycin D, cycloheximide and puromycin on
thyroid stimulation.
Endocrinology 83, 1132-1139, 1968.
84. MANNING, J.P., INGLIS, N.R., GREEN, S. and FISHMAN, W.A.
Characterisation of AlPase from rat pregnant and pseudo-
pregnant deciduae fetal placentae anestrus uteri and small
intestine.
Enzymologia 37, 262-272, 1969.
85. MANNING, J.P., INGLIS, N.R., GREEN, S. and FISHMAN, N.A.
Characterisation of placental AlPase from rabbit, guinea-pigg,
mouse and hamster.
Enzymologia 39, 307-318, 1970.
86. MELANI, F. and FARNARARO, M.
Evidence for the identity of AlPase and inorganic pyro-
phosphatase in rat kidney.
Biochim. Biophys. Acta 178, 93-99, 1969.
87. MELNYKOWYCH, G.
Glucocorticoid induced resistance to deoxycholate lysis in Hela
cells.
Science, 152, 1086-1087, 1966.
88. MOOG, F.
Intestinal AlPase.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 166, 447-465, 1969.

89. MOOG, F. and WENGER, E.L.

The occurrence of a neutral mucopolysaccharide at sites of high AlPase activity.

Am. J. Anat. 90, 339-371, 1952.

90. MOOG, F.

The functional differentiation of the small intestine.

I. The accumulation of alkaline phosphomonoesterase in the duodenum of the chick.

J. Exp. Zool. 115, 109-129, 1950.

91. MOOG, F.

The functional differentiation of the small intestine.

II. The differentiation of AlPase in the duodenum of the mouse.

J. Exp. Zool. 118, 187-207, 1951.

92. MOOG, F.

The functional differentiation of the small intestine.

III. The influence of the pituitary adrenal system on the differentiation of AlPase in the duodenum of the suckling mouse.

J. Exp. Zool. 124, 329-346, 1953.

93. MOOG, F.

The functional differentiation of the small intestine.

IX. The influence of thyroid function on cellular differentiation and accumulation of AlPase in the duodenum of the chick embryo.

Gen. Comp. Endocrinol. 1, 416-432, 1961.

94. MOOG, F.

The adaptations of AlPase and Acid Pase in development.

Cell. Organism and Milieu p. 121-155.

Editions Rudmick, D. Ronald Press, N.Y. 1959.

95. MOOG, F.

The regulation of AlPase activity in the duodenum of the mouse from birth to maturity.

J. Exp. Zool. 161, 353-368, 1966.

96. MORTON, R.K.

The purification of AlPases of animal tissues.

Biochem. J. 57, 595-603, 1954.

97. MORTON, R.K.

The substrate specificity and inhibition of AlPases of cow's milk and calf intestinal mucosa.

Biochem. J. 61, 232-240, 1955.

98. MOSS, D.W.

Properties of AlPase fractions in extracts of human small intestine.

Biochem. J. 94, 458-462, 1965.

99. MURUMATSU

Effect of cycloheximide on the nucleolar RNA synthesis in rat liver.

J. Mol. Biol. 53, 91-106, 1970.

100. NAKAYAMA, T., YOSHIDA, M., KITAMURA, M.
L-leucine sensitive heat stable AlPase isoenzyme detected in
patient with pleuritis carcinomatosa.
Clin. Chim. Acta 30, 545-548, 1970.
101. NATHANS, O.
Puromycin.
Antibiotics Ed. Gohlieb, D. and Shaw, P.D. 259-277
Springer Verlag, N.Y., 1967.
102. NATHANSON, L. and FISHMAN, W.H.
New observations on the regan isoenzyme of AlPase in cancer
patients.
Cancer 27, 1388-1397, 1971.
103. NATORI, J. and GAREN, A.
Molecular heterogeneity in the amino terminal region of AlPase.
J. Mol. Biol. 49, 477-488, 1970.
104. NAYUDU, P.R. and MILES, P.L.
Inhibition of pyrophosphatase activity of mouse duodenal AlPase
by Mg ions.
Biochem. J. 115, 29-35, 1969.
105. NEUMANN, H. and VREEDENDAAL, M.V.
An improved AlPase determination with pnitro-phenyl phosphate.
Clin. Chim. Acta 17, 183-187, 1967.

106. NORMAN, A.W., MIRCHEFF, A.K., ADAMS, T.H. and SPIELVOGEL, A.

Studies on the mechanism of action of calciferol.

III. Vitamin D mediated increase of intestinal brush border AlPase activity.

Biochim. Biophys. Acta 215, 348-359, 1970.

107. NOVIKOFF, A.B. and GOLDFISCHER, S.

Nucleoside-diphosphatase activity in the golgi apparatus and its usefulness for cytological studies.

Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 802-807, 1961.

108. NOVIKOFF, A.B., KORSON, L. and SPATER, H.W.

AlPase activity in the golgi substance of intestinal mucosa.

Exp. Cell. Res. 3, 617-718, 1952.

109. OBRIG, T.G., CULP, W.J., MCKEEHAN, W.L. and HARDESTY, B.

The mechanism by which cycloheximide inhibits peptide synthesis on reticulocyte ribosomes.

J. Biol. Chem. 241, 1-7, 1971.

110. OVERTON, EICHHOLZ and CRANE

Studies on the organisation of the brush border in intestinal epithelial cells.

J. Cell. Biol. 26, 693-698, 1965.

111. PETERKOFISKY, B.

The inactivation of chick tyrosine aminotransferase by acid and alkaline phosphatases.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1171-1178, 1971.

112. PIMSTONE

Decrease in serum AlPase activity produced by Mg depletion in rat.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 201-205, 1966.

113. PITTS, B.J.R. and ASKARI, A.

1. A fluorometric assay method for the K^+ phosphatase associated with the (Na^+ , K^+) activated AtPase.

Biochim. Biophys. Acta 227, 453-459, 1971.

114. PITTS, B.J.R. and ASKARI, A.

2. Stimulation of the phosphatase activity of (Na^+ , K^+) AtPase preparation by Ouabain.

Biochim. Biophys. Acta 225, 388-391, 1971.

115. POSEN, S.

Alkaline phosphatase.

Ann. Int. Med. 67, 183-203, 1967.

116. POSEN, S., NEALE, F.C., BIRKETT, D.J. and BRUDENELL-WOODS, J.

Intestinal AlPase in human serum.

Amer. J. Clin. Path. 48, 81-86, 1967.

117. PRESANT, C.A., WIERNIK, P.H. and SERPICK, A.A.

Effects of phenylalanine and related compounds on serum AlPase assay.

Clin. Chim. Acta 32, 465-469, 1971.

118. REDGRAVE, T.G. and ZILVERSMIT, D.B.

Does puromycin block release of chylomicrons from the intestine?

J. Physiol. 217, 336-340, 1969.

119. ROBINSON, J.D.

K^+ stimulated incorporation of ^{32}P from nitrophenyl phosphate into a ($Na^+ K^+$) activated AtPase preparation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 880-885, 1971.

119. SAINI, P.K. and POSEN, S.

bis

Origin of serum alkaline phosphatase in the rat.

Biochim. Biophys. Acta 177, 42-49, 1969.

120. SCHIEBLER, T.H. and PILGRIM, C.H.

Zur regulation der chemodifferenzierung der niere.

Histochemie 14, 17-32, 1968.

121. SEMB, T.H., GUDMUNDSON, C.R., WESTLIN, N.E. and

HALLANDER, L.B.

AlPase activity and isoenzymes in experimental fractures.

Clin. Chim. Acta 31, 375-380, 1971.

122. SEREBRO, H.A., IBER, F.L., YARDLEY, J.H. and HENDRIX, T.R.

Inhibition of cholera toxin action in the rabbit by cycloheximide.

Gastroenterology 56, 506-511, 1969.

123. SIGEL, H., GRIESSER, R. and MCCORMICK, D.B.

Manganese (II) and Copper (II) histidine complexes.

Arch. Biochem. Biophys. 134, 217-227, 1969.

124. SISLER, H.D. and SIEGEL, H.R.
Cycloheximide and other glutarimide antibiotics.
Antibiotics. Ed. Gohlieb, D. and Shaw, P.
Springer-Verlag, 283-307, 1967.
125. SMITH, I.
Chromatographic and electrophoretic techniques.
2nd Ed. Vol. 2, 1968.
126. SMITH, I., LIGHSTONE, P.J. and PERREY, J.O.
Separation of human AlPases by electrophoresis on acrylamide
disc gels.
Clin. Chim. Acta 19, 499-505, 1968.
127. SPENCER, T.
Some factors controlling AlPase Isoenzymes in Hela Cells.
Biochem. J. 16, 927-938, 1970.
128. SRIKANTIAH, M.V. and KADHAKRISHNAN, A.N.
Studies on the metabolism of vit. B6 in the small intestine.
Part II. Heterogeneity of monkey intestinal AlPase.
Indian J. Biochem. 7, 145-150, 1970.
129. SRIKANTIAH, M.V. and KADHAKRISHNAN, A.N.
Studies on the metabolism of vit. B6 in the small intestine.
Part III. Purification and properties of monkey intestinal
pyridoxal kinase.
Indian J. Biochem. 7, 151-156, 1970.

130. STENRAM, U. and WILLEN, R.

Radioautographic, ultrastructural and biochemical studies on the effect of fluorouracil on the RNA synthesis in the liver of rats.

Z. Zellforsch. 82, 270-281, 1967.

131. STENRAM, U.

The effect of high carbohydrate, fat, or protein diets, and of starvation on the histochemically determined phosphatases in the epithelium of the small intestine in rat.

Acta Anat. 20, 101-103, 1954.

132. STOLBACH, L.L., MELVIN, J.K. and FISHMAN, W.H.

Ectopic production of an AlPase isoenzyme in patients with cancer.

New England J. Med. 281, 757-762, 1969.

133. SUSO, F.A. and EDWARDS, H.M. Jr.

Binding capacity of intestinal mucosa and blood plasma for zinc.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 306-309, 1971.

134. TASCA, R.J. and HILLMAN, N.

Effects of actinomycin D and cycloheximide on RNA and protein synthesis in cleavage stage mouse embryos.

Nature 225, 1022-1025, 1970.

135. THRELFALL, G. and TAYLOR, D.M.

Modification of folic acid-induced changes in renal nucleic acid and protein synthesis by actinomycin D and cycloheximide.

Eur. J. Biochem. 8, 591-596, 1969.

136. TUBA, J. and ROBINSON, M.I.

The response of intestinal AlPase of fasted rats to forced feeding of fat.

J. Biol. Chem. 203, 947-951, 1953.

137. TUBA, J. and DICKIE, N.

The role of AlPase in intestinal absorption.

II. The effects of various carbohydrates on levels of the enzyme in intestinal mucosa.

Can. J. Biochem. 32, 621-624, 1954.

138. TUBA and TRIANTAPHYLLOPOULOS

Changes in intestinal and serum AlPase levels during absorption of certain AA.

Can. J. Biochem. Physiol. 37, 711-719, 1959.

139. VERBIN, R.S. and FARBER, E.

Effect of cycloheximide on the cell cycle of the crypts of the small intestine of the rat.

J. Cell Biol. 35, 649-658, 1967.

140. VERBIN, R.S., SULLIVAN, R.J. and FARBER, E.

The effects of cycloheximide on the cell cycle of the regenerating rat liver.

Lab. Invest. 21, 179-182, 1969.

141. VERBIN, R.S., GOLDBLATT, P.J. and FARBER, E.

The biochemical pathology of inhibition of protein synthesis in vivo.

Lab. Invest. 20, 529-536, 1969.

142. VRENSEN, G.

The influence of cycloheximide on the deposition and localisation of glycogen in the liver of fasted rats.

J. Microscopie 9, 749-769, 1970.

143. WACHSTEIN, M. and MEISEL, E.

On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase.

J. Histochem. Cytochem. 4, 595-601, 1956.

144. WARNOCK

Intestinal AlPase and fat absorption.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 129, 768-773, 1968.

145. WARREN, L. and GLICK, M.C.

Membranes of Animal Cells.

II. The metabolism and turnover of the surface membrane.

J. Cell. Biol. 37, 729-746, 1968.

145. WASKHO, M.E. and RICE, E.W.

bis

Determination of glucose by an improved enzymatic procedure.

Clin. Chem. 7, 542-547, 1961.

146. WILLEMS, M., PENMAN, M. et PENMAN, S.

The regulation of RNA synthesis and processing in the nucleolus during inhibition of protein synthesis.

J. Cell. Biol. 41, 177-187, 1969.

147. WILLIAMS, G.H.

Developmental patterns of AlPase activity in the small intestine of the syrian hamster.

Int. J. Biochem. 1, 715-727, 1970.

148. WILSON and RAID

Conformational isomers of AlPase in the mechanism of hydrolysis.

Biochemistry 10, 380-387, 1971.

149. YOUNG, C.W., ROBINSON, P.F. and SACKTOR, B.

Inhibition of the synthesis of protein in intact animals by acetoxycycloheximide and a metabolic derangement concomitant with this blockage.

Biochem. Pharmacol. 12, 855-865, 1963.

LEGENDES

A) Légende des schémasSchéma 1;

Les deux représentations du dimère de la molécule de phosphatase alcaline sous forme libre (R), et active (T), selon le schéma de M. LAZDUNSKI et al (B 69).

Schéma 2;

Mécanisme "Flip-Flop" de la phosphatase alcaline d'E. coli à pH alcalin, selon M. LAZDUNSKI et al (B 69).

Schéma 3;

3A: Variations du taux de phosphatase alcaline duodénale selon les stades de développement chez la souris, d'après F. MOOG (B 88, 91 et 95).

3B: Répartition du rapport $\frac{\text{Phénylphosphate}}{\text{Bétaglycérophosphate}}$ selon les niveaux du villus duodéal étudié en coupes transverses (F. MOOG; B 88).

3C: Répartition électrophorétique des isoenzymes de l'AlPase duodénale chez la souris jeune (11 j.) et adulte (20 j.) selon F. MOOG (B 88). Noter les 3 bandes constituant les "low ratio AlPases" -inséparables par chromatographie (DEAE-Sephadex)- dont MOOG et ETZLER (B 28, 29) ont montré, par immunochimie, qu'elles

donnaient naissance aux IRP, facilement séparables des HRP sur sephadex.

Schéma 4;

Répartition électrophorétique de l'AlPase présente dans un des sera humains que nous avons étudiés, rapporté au pattern protéinique du même sérum traité dans les mêmes conditions de migration.

Les protéines ont été colorées, soit au rouge Ponceau (0,6 g dans TCA 12%), soit au bleu de chromasie (0,25 g dans TCA 12%), et les gels décolorés ensuite à l'acide acétique 8% pendant 72 heures. Noter la migration des isoenzymes placentaire, puis "osseuse - hépatique" au niveau des α globulines, et la traînée intestinale au niveau β - α globulines; les "slow components" restent proches de l'origine.

Schéma 5;

Type de réaction chimique permettant de coupler un sel de naphthol et un sel de diazonium en un complexe coloré, stable dans le temps, et sur les gels d'électrophorèse, aux sites de migration des isoenzymes de l'AlPase.

Schéma 6;

Diagramme visualisant les résultats du tableau 7 relatifs à l'étude du cycloheximide chez la souris, dans l'intestin, le foie et le sang, de souris témoins (T) ou traitées au cycloheximide (C).

Schéma 7;

Récapitulatif des données récentes de MOOG (B. 92 et 93 et 94), COX (B. 18), et GRIFFIN (B. 43), sur le rôle et la régulation de l'AlPase.

Schéma 8;

Formules des principaux composés aminés impliqués dans des interrélations avec l'AlPase.

B) Légende des tableaux

Tableau 1;

1A: Influence du milieu d'extraction, de la conservation thermique, et du jeûne, sur l'activité AlPase (pH 10, 37°C), dans l'intestin, le foie, et le sang de souris.

1B: Stades de purification obtenus lors de l'extraction de l'AlPase au N butanol, dans l'intestin et le foie de souris (ICR).

Tableau 2;

Comparaison, sur PNPP (pH 10, et 37°C) des activités AlPase normale (AN), ou en présence de 5mM de L Phé-nyl alanine (L), avant et après dialyse des extraits:

-Intestinaux: Doudénum, Jéjunum dans sa lère partie

(Jej₁), son centre (Jej), et sa dernière partie (Jej₂)

-Hépatiques, et biliaire (VB= Vésicule biliaire)

-Et sanguins.

Tableaux 3 et 4;

Comparaison des activités Dipeptidasiques (sur Glycyl L Leucine, et Glycyl L Valine à pH 7 et 40°C) et AlPase (sur PNPP à pH 10 et 37°C), chez deux séries de souris, les unes à jeûn, les autres pas; chaque série recoit, soit un régime complet (Caséine totale), soit une diète Hydrolysée, avec les mêmes éléments essentiels de base(glucides, lipides, ions, vitami-

nes, etc...).

Tableau 5;

Micro analyse spectrophotométrique (sur Phenylphosphate pH 10, 37°) des différentes bandes séparées en électrophorèse, et coupées à même le gel, comparativement à un témoin coloré. Cette analyse n'a pu être réalisée avec le Betaglycérophosphate trop peu sensible.

Tableau 6;

Etude des variations de l'activité AlPase (sur PNPP à pH 10 et 37°C) normale (AN), ou en présence de 5 mM de L phénylalanine (A + L φ), dans l'intestin et le foie de deux races de souris (5 SWR et 5 ICR), avant, et après administration forcée d'un régime gras (huile de maïs commerciale), consécutivement aux 12 h. de jeûne réglementaire.

Tableau 7;

Etude des variations de l'activité AlPase (sur PNPP à pH 10 et 37°C) dans l'intestin, le sang et le foie de souris (2 fois 20 ICR) avant et après traitement au cycloheximide (40 γ /g) en une seule, ou deux injections.

Tableau 8;

Action du 5 Fluorouracile (5 FU) sur l'activité AlPase sérique (PNPP, pH 10, 37°C) de patients affligés de tumeurs

cancéreuses intestinales.

Tableau 9;

Comparaison de l'activité AlPase (pH 10 et 37°C) duodé-
-nale à pH 10 (avec ou sans L phénylalanine 5 mM) et à pH 10, 3
selon la concentration en substrat (PNPP).

C) Légendes des courbesCourbe 1;

Application de la loi de Beer-Lambert entre la densité optique au spectrophotomètre Zeiss, et la concentration d'albumine témoin (produit Sigma) dosée selon la méthode protéique de Lowry et al. (B. 78) à 500 m μ .

Courbe 2;

Linéarité entre la D.O. à 410 m μ et la concentration de paranitrophénol libre (PNP; produit Sigma) à pH 10 et 37°C dans le tampon carbonate bicarbonate 0,1 M ($I = 0,36$), à une concentration de $2 \cdot 10^{-3}$ M en magnésium.

La relation simple qui se dégage de cette droite est la suivante;

$$0,1 \text{ de D.O.} = 0,06 \text{ micromole de PNP}$$

Courbe 3;

Relation linéaire existant entre la D.O. à 770 m μ et la concentration de Pi (H_3PO_4 , produit Fisher) dosé selon la méthode de Dryer et al (B. 24) dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Courbe 4;

Loi de Beer Lambert appliquée à la D.O. (420 m μ), fonction de la concentration de glucose dosé selon la méthode au glucostat.

Courbe 5;

Courbes étalons permettant de relier directement la D.O. à 220 m μ à la concentration de Glycyl-L-leucine ou Gly-L-valine (produits NBC \circ .) subsistant après action des dipeptidases, dosées selon Josefson (B. 55, 56, 57).

A la densité mesurée correspond la concentration réelle de dipeptide, puisque celle-ci est corrigée automatiquement de la concentration complémentaire des acides aminés qui seraient libérés par l'action enzymatique.

Les relations sont les suivantes:

0,35 de D.O. = 1,3 micromole de Gly-L-Leu ()

0,22 de D.O. = 0,6 micromole de Gly-L-Val ()


Courbe 6;

Cinétique de l'extrait duodéal traité en 5 minutes sur PNPP à pH 10 et 37°C en représentation de Lineweaver Burk;

; droite de bonne spécificité de l'AlPase pour son substrat.

$$K_M = 4,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V_M = 334 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

; droite de faible spécificité.

$$K_M = 1,67 \cdot 10^{-2} \text{ M}$$

$$V_M = 1000 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

La concentration de PNPP adoptée dans les dosages courants

($2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) est choisie la plus grande possible, à partir de la courbe de bonne spécificité.

Courbe 7;

Cinétique de l'extrait duodénal traité en 5 minutes sur Phényl et Betaglycérophosphate à pH 10 et 37°C.

—○—; Courbe cassée relative au phenylphosphate.

$$K_M = 8,65 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$V_M = 312 \text{ } \mu\text{moles Pi/mn/mg prot.}$$

—■—; Courbe relative au Betaglycérophosphate.

$$K_M = 2,08 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V_M = 67 \text{ } \mu\text{moles Pi/mn/mg prot.}$$

V_M et K_M ne sont calculés que pour les droites correspondant à l'affinité maxima de l'enzyme pour son substrat. Il en sera de même dans toute la suite.

Courbe 8;

Cinétique de l'extrait duodénal traité en 5 mn sur PNPP à pH 9,2 dans le tampon $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{--}$ de force ionique $I = 0,115$ et contenant $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ de Mg.

—○—; Activité AlPase normale.

$$K_M = 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V_M = 714 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

—○—; Activité AlPase en présence de L phénylalanine (5 mM).

$$K_{M\varphi} = 2,78 \cdot 10^{-3}$$

$$V_{M\varphi} = 342 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

Courbe 9;

Cinétique de l'extrait duodénal traité en 5 mn sur PNPP à
pH 10,3 ($\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{--}$; $I = 0,36$; $(\text{Mg}) = 2 \cdot 10^{-3}$)

—•—; Activité AlPase normale

$$K_M = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$V_M = 92 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

—•—; Activité en présence de L phénylalanine (5 mM)

$$K_{M\phi} = 13,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$V_{M\phi} = 216 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

Courbe 10;

10A: Cinétique de l'extrait hépatique traité en 20 mn sur PNPP
à pH 10 (conditions courantes).

—•—; Activité AlPase normale

$$K_M = 6,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V_M = 4,92 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

—•—; Activité en présence de L phénylalanine (5 mM)

$$K_{M\phi} = 4,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$V_{M\phi} = 4,1 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

10B: Aspect obtenu à pH 10,3 (activité normale)

$$V_M = 0,48 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

$$K_M = 9,1 \cdot 10^{-4}$$

Courbe 11;

Aspect cinétique de l'extrait hépatique sur PNPP à pH 9,2
($\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{--}$; $I = 0,115$; $(\text{Mg}) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)

— ; Activité AlPase normale

$$K_M = 7,1 \cdot 10^{-4} M$$

$$V_M = 7,7 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

— ; Activité en présence de 5 mM de L phénylalanine

$$K_{M_p} = 6,3 \cdot 10^{-4} M$$

$$V_{M_p} = 6,7 \text{ } \mu\text{moles PNP/mn/mg prot.}$$

Courbe 12;

Aspect cinétique de l'extrait sanguin traité dans les mêmes conditions que l'extrait hépatique (Courbe 11).

— ; Activité normale

$$K_M = 5 \cdot 10^{-2} M$$

$$V_M = 1,5 \text{ } \mu\text{mole PNP/mn/mg prot.}$$

— ; Activité en présence de L phénylalanine (5 mM)

$$K_{M_p} = 1,12 \cdot 10^{-2} M$$

$$V_{M_p} = 1,0 \text{ } \mu\text{mole PNP/mn/mg prot.}$$

$$\frac{V_M - V_{M_p}}{V_M} = 33\%$$

Courbe 13;

13A Scanning des électrophorégrammes relatifs aux extraits intestinal et hépatique avant et après 1 ou 2 injections de cycloheximide.

13B Aspects relatifs au jéjunum et au sang.

— ; Animaux contrôles (à jeûn 12 heures).

— — ; Animaux traités à 1 injection de cycloheximide (40 μ /g)

et sacrifiés 2 h. après.

.....; Animaux traités à 2 injections à 4 h. d'intervalle, et sacrifiés 2 h. après la dernière.

Pour l'intestin.

- 1; bande de plus haut R_F (IRP).
- 2; bande de R_F intermédiaire (HRP) se décomposant en 2 sous-unités Ib et 2.
- 3; "slow components".
- 4; zone des dépôts.

Pour le foie et le sang.

- A; bande dite "hépatique et osseuse".
- B; bande de R_F immédiatement inférieur, sensible au cycloheximide.
- C; traînée de type intestinal.
- D; "slow components".

Courbe 14;

Variation de l'activité AlPase dans le duodénum, le foie et le sang (sur PNPP dans les conditions courantes) en fonction de concentrations croissantes de magnésium exogène.

—•—; Intestin normal.

—•—•—; Activité intestinale en présence de L phenylalanine (5 mM).

—•—•—; Activité hépatique.

—•—•—; Activité sérique.

Courbe 15;

15A Variation de l'activité AlPase dans le duodénum en fonction de la force ionique (I) du tampon, (PNPP; pH 10; (Mg) = $2 \cdot 10^{-3}$ M).

—•—; Activité duodénale normale.

—○—; Courbe donnant le log de cette activité en fonction de I.

—■—; Activité duodénale en présence de L phenylalanine 5 mM.

15B Variations de l'activité AlPase dans le foie, en fonction de I.

Courbe 16;

16A Variations de l'activité AlPase dans le duodénum en fonction du pH (sur PNPP; I = 0,115; et (Mg) = $5 \cdot 10^{-3}$ M).

—•—; Activité intestinale normale; pH optimum 8,6.

—■—; Activité intestinale en présence de L phenylalanine (5 mM).

16B Aspect semblable, obtenu dans les mêmes conditions, sur phenylphosphate.


Courbe 17;

17A Variations de l'activité AlPase dans le foie, en fonction du pH (dans les conditions de la courbe 16).

—■—; Activité hépatique normale; pH optimum; 9,5.

—■—; Activité hépatique en présence de L phenylalanine.

17B Même étude appliquée au sang.

; Activité sérique normale; pH optimum: 9

; Activité sérique en présence de L phenylalanine (5 mM).

D) Légendes des Photos.

Les photos 1 à 7 sont consacrées aux résultats relatifs aux électrophorèses sur gel d'acrylamide, à 400 V, pendant 1 heure à 0°C, dans le tampon tris borate. Le sens de migration (Catode Anode) est indiqué par une flèche.

Pour les extraits enzymatiques étudiés chez la souris, les dépôts sont les suivants:

5 microlitres (μ l) pour le Duodénum.

15 microlitres pour le Jéjunum.

40 microlitres pour le Foie.

60 microlitres pour le Sérum.

Photo 1;

Influence du pH sur la séparation et la migration des isoenzymes de l'AlPase duodénale sur gels à 6%.

Tube 1: pH 8.2

Tube 2: pH 9.5

Tube 3: pH 10.2

Tube 4: pH 10.6

Photo 2 ;

2 A: Influence de la concentration du gel, sur la séparation des isoenzymes de l'extrait Duodéal.

Tube 1: 4.5%

Tube 2: 5%

Tube 3: 5.8%

Tube 4: 6.3%

Tube 5: 8%

2B:

Tubes 1 et 2: Séparation des isoenzymes sériques à 4.5, et 6.3%.

Tubes 3 et 4: Séparation des isoenzymes hépatiques aux mêmes concentrations respectives.

Photo 3:

Pattern électrophorétique normal des extraits enzymatiques étudiés chez la souris, sur gels de 8% à pH 9,5.

Tube 1: Duodénum avec ses 3 bandes 1, (IRP), 2, (HRP) et 3 ("slow components"), déjà décrites dans la courbe 13.

Tube 2: Jéjunum avec ses bandes 1, 1b (seconde isoenzyme séparable des HRP), 2 et 3.

Tube 3: Foie avec ses bandes A, B, C et D.

Tube 4: Sang avec sa bande A ("hépatique-osseuse").

Photo 4:

Comparaison des isoenzymes sériques de différentes espèces sur gels de 5% à pH 9,5.

Tube 1: Sang de souris normale avec ses bandes A et C.

Tube 2: Sang humain normal avec ses bandes A et C.

Tube 3: Sang humain à 3 bandes.

P: placentaire

A: "hépatique-osseuse"

C: "Intestinale"

Tube 4: Le même sang après imprégnation 10' du gel dans la L phenylalanine (5 mM).

C'est le seul exemple où l'acide aminé entraîne véritablement une inhibition sélective de l'isoenzyme intestinale (C).

Tube 5: Sang humain à 2 bandes

P: placentaire

A: "hépatique-osseuse"

Tube 6: Sang de rat avec sa bande A peu prononcée et sa bande intestinale (C) très marquée.

Photo 5:

Etude de l'inhibition à la L phenylalanine (5 mM) à même les gels, pendant 10 minutes.

Tube 1: Duodénum normal.

Tube 2: Activité duodénale subsistant à la coloration, après 10' de L phenylalanine.

Tube 3: Foie normal.

Tube 4: Foie + L ψ

Tube 5: Sang normal.

Tube 6: Sang + L φ

Photo 6;

Augmentation générale de phosphatase de type intestinal dans les extraits après ingestion forcée d'un régime gras (huile de maïs commerciale) chez des souris ICR au jeûne pendant 12 heures.

Tube 1: Duodénum témoin.

Tube 2: Duodénum traité; noter l'augmentation de toutes les bandes.

Tube 3: Foie témoin

Tube 4: Foie traité; noter la différenciation de la bande C (intestinale).

Tube 5: Sang témoin.

Tube 6: Sang traité; là encore la bande C est très nette.

Photo 7;

Electrophorèses des sérums de quelques patients cancéreux (cf. tableau 8) traités au 5 Fluorouracile (5 FU), sur gels de 5% à pH 9,5. Les dépôts sont de 20 microlitres.

7A:

Tubes 1 à 3: Activité AlPase mise en évidence dans le sérum du patient No 1 avant, pendant et après traitement au 5 FU.

Tubes 4 à 6: Etude semblable chez le patient No 2.

Noter l'augmentation du R_F de la bande A (hépatique-osseuse) au fur et à mesure du traitement, et la netteté de la bande D (slow components) qui semble stable.

7B:

Tubes 1 et 2: Forte activité enregistrée chez le patient No 4, avec permanence du phénomène de déplacement de la bande A.

Tubes 3 à 5: Autre variation personnelle enregistrée chez le patient No 8, avec l'existence de 2 bandes nettes qui semblent être les A et C (intestinale).

Les photos 8 à 17 sont consacrées aux résultats morphologiques et histochimiques.

Photo 8;

8A:

Zone golgienne d'une cellule absorbante après 7 injections de cycloheximide.

Le nombre des citernes aux extrémités dilatées, est restreint.

De nombreux petits corps osmiphiles sont condensés dans ces vacuoles de dilatation.

8B:

Zone golgienne d'une cellule absorbante après 7 injections de cycloheximide.

Deux citernes externes du golgi sont plus minces et plus denses que les autres, dont, en outre, elles sont séparées par maints organites.

X 66,400

Photo 9;

Cellules absorbantes du villus après 7 injections de cycloheximide.

Des vacuoles autophagiques apparaissent dans la partie apicale de la cellule.

X 26,200

Photo 10;

Cellule caliciforme du villus après 7 injections de cycloheximide.

Ce qui reste des granules de mucus est condensé dans la partie apicale de la cellule, qui, apparemment, est vidée de tout produit de sécrétion; les granules apparaissent plus denses et plus petits que dans les contrôles.

X 12,900

Photo 11;11A

Cellules hépatiques après 40 μ /g de cycloheximide; noter le rapprochement des mitochondries (M) et de membranes dérivant du réticulum endoplasmique (flêché) rugueux (les ribosomes sont notés R).

X 48,200

11B

Cellules hépatiques après 40 μ /g de cycloheximide; noter la mobilisation des vacuoles lipidiques (notées L).

X 37,700

Photo 12;12A

Activité AlPase; villosités duodénales des souris contrôles; la réaction est très marquée dans la bordure en brosse et dans la zone golgienne des cellules absorbantes.

X 330

12B

Aspect obtenu après une injection de cycloheximide (40 μ /g); la zone golgienne est totalement dénuée de tout produit de réaction, alors que la bordure en brosse présente toujours un très fort marquage.

X 330

Photo 13;13A

Cellules absorbantes d'une villosité contrôle. La bordure en brosse et la zone golgienne réagissent nettement à la réaction AlPase.

X 4, 100

13B

Aspect obtenu après une injection de cycloheximide (40 μ /g).
La zone golgienne ne réagit plus.

X 4, 100

Photo 14;14A

Cellule absorbante contrôle; toutes les citernes golgiennes répondent nettement à la réaction AlPase.

X 36, 700

14B

Aspect obtenu deux heures après 40 μ /g de cycloheximide; toutes les citernes golgiennes sont exemptes de précipité de phosphate de plomb; lequel n'est présent que dans des corps denses adjacents.

X 51, 600

Photo 15;15A

Cellule absorbante contrôle; noter le marquage du Golgi

et de la bordure en brosse.

X 29, 100

15B

Aspect obtenu deux heures après 40 μ /g de cycloheximide; le marquage subsiste dans la bordure en brosse, mais pas dans le Golgi.

X 18, 500

Photo 16;

16A

Cellules hépatiques contrôles, montrant les replis membranaires des canalicules biliaires.

X 48, 200

16B

Activité ALPase normale mettant en évidence le précipité de phosphate de plomb au niveau de la membrane des canalicules biliaires.

X 62, 000

Photo 17;

Activité thiaminepyrophosphatase (TPPase) après 7 injections de cycloheximide. Seule une citerne golgienne présente un dépôt de phosphate de plomb.

X 57, 800

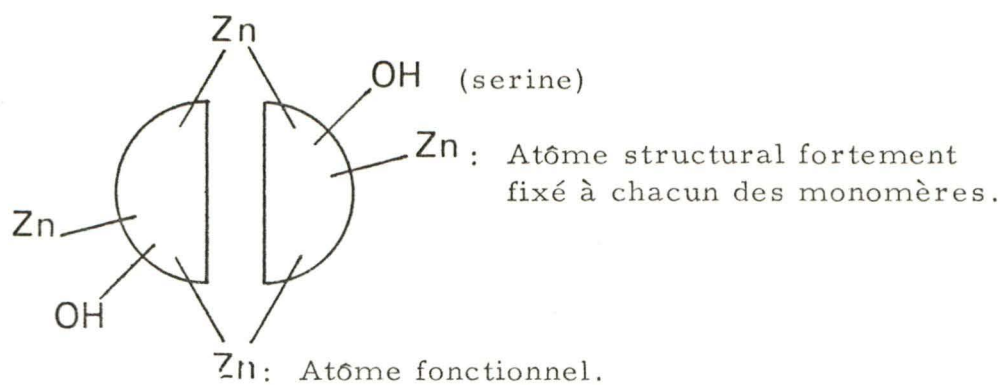
Photo 18;

Activité Glucose 6 phosphatase (G-6-Pase) dans les cellules absorbantes du villus duodénal, 2 heures après 40 μ /g de cycloheximide.

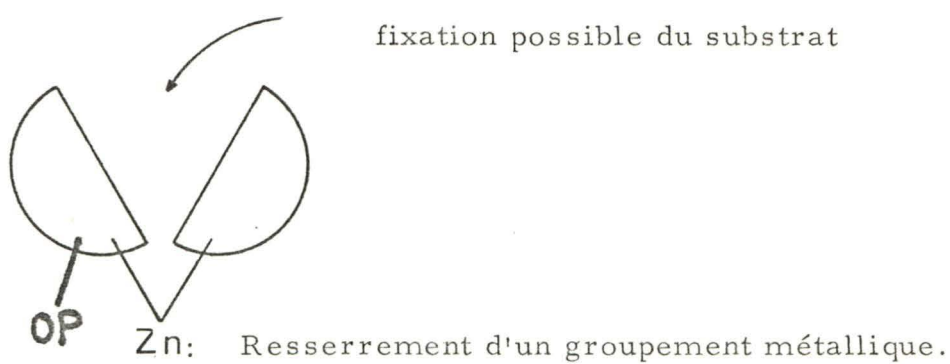
Aucune modification de l'intensité de la réaction dans le réticulum endoplasmique n'apparaît.

X 6,300

SCHEMAS



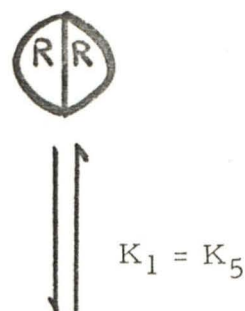
SCHEMA 1A: Enzyme "Relaxe" (R) en ses deux sous-unités "tête-bèche".



SCHEMA 1B: Enzyme sous forme active, "tight" (T).

Dimère symétrique sous forme R
("Relaxe")
C'est l'enzyme sous forme pure E_0
telle que trouvée à pH alcalin

S
(Substrat)



Fixation non covalente
de 2 P_i

Le substrat se fixe de façon non
covalente à la forme T ("tight")
de l'enzyme.
Cette 1ère étape aboutissant à la
formation d'un composé asymétrique
a été démontrée par GUTFREUND.

K_2

Phosphorylation de
l'enzyme et hydrolyse
du substrat



Forme monophosphorylée

S
(2ème molec. de substrat)



Formes hybrides en équilibre,
comportant un phosphate covalent
et un substrat non covalent.



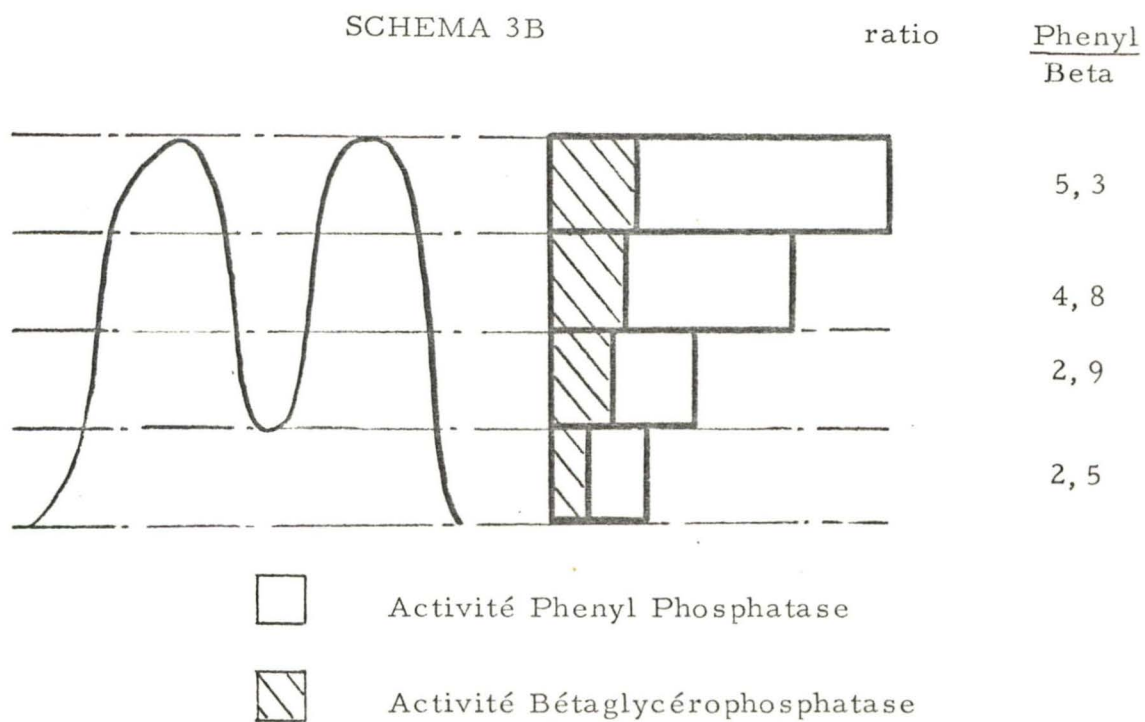
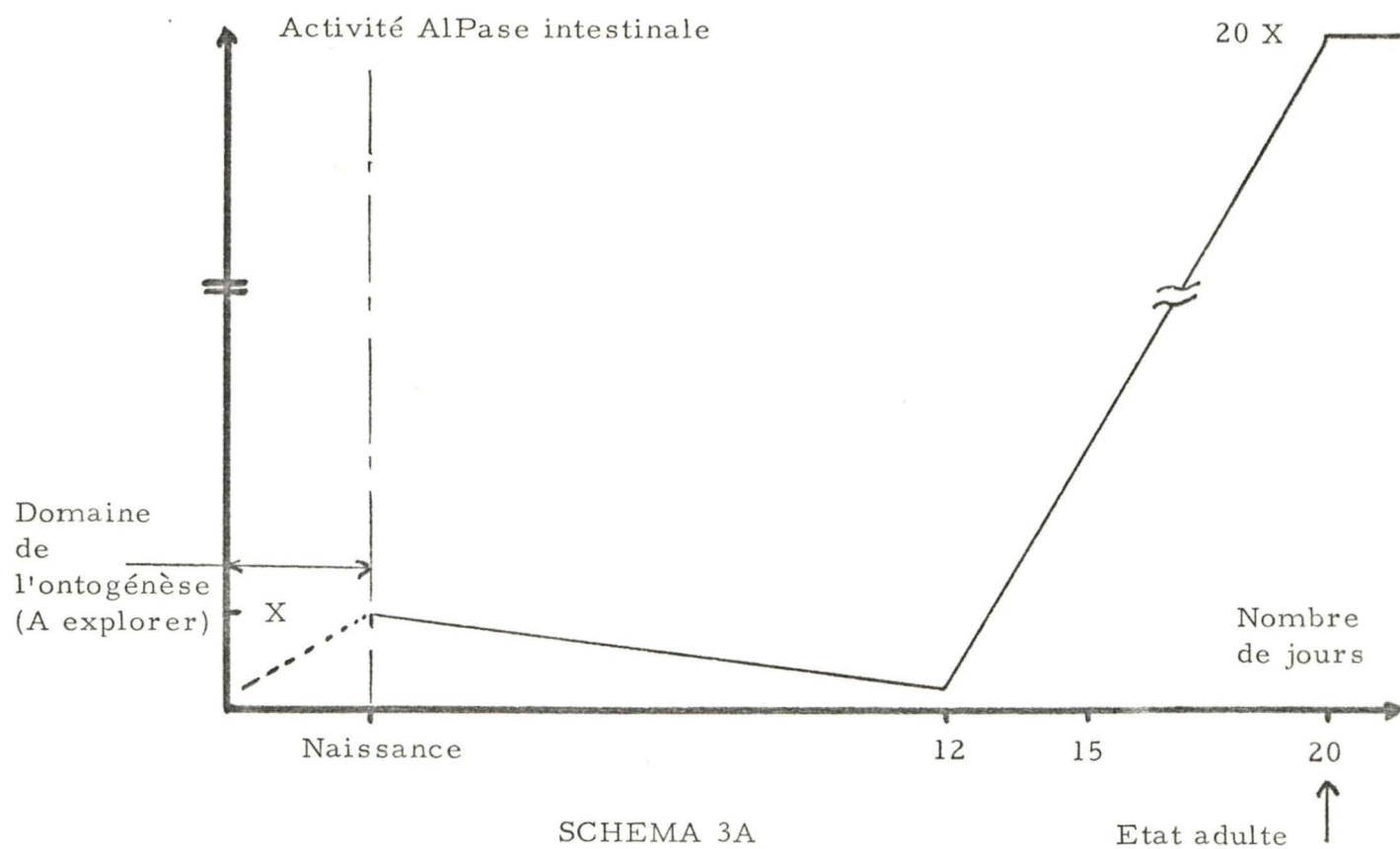
Dephosphorylation: étape la plus
lente, donc, cinématiquement
déterminante.

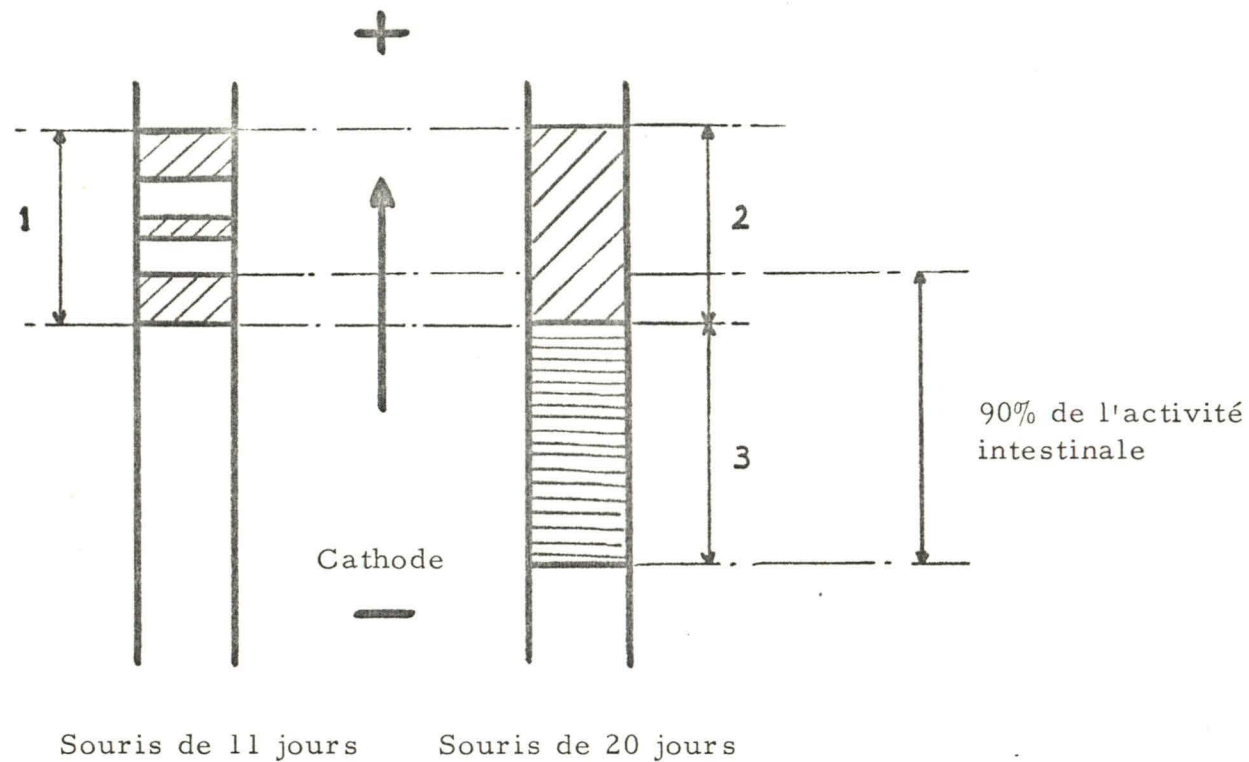


:

etc...

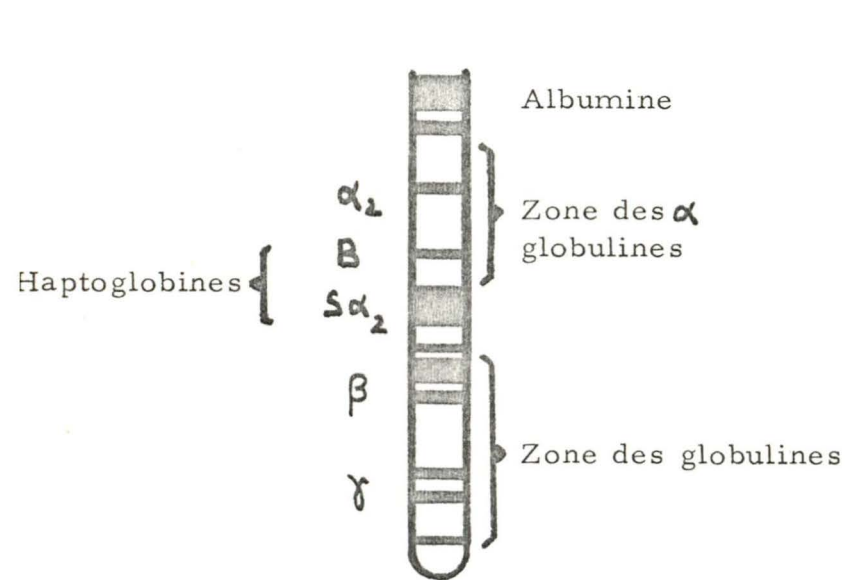
SCHEMA 2





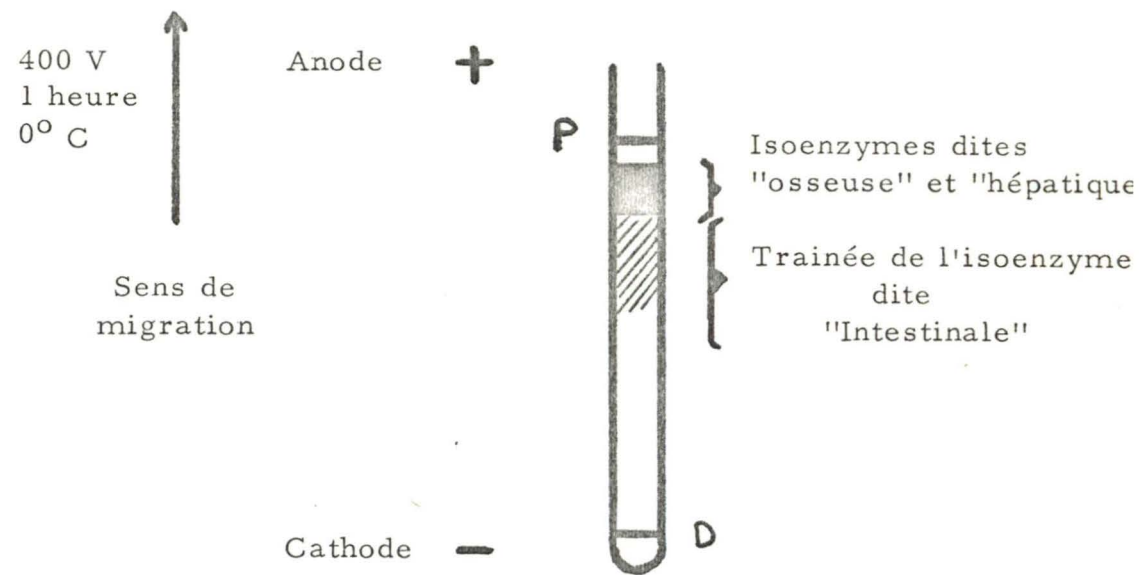
- 1** ; Première famille d'isoenzymes apparaissant lors du développement postnatal.
Ce sont les LRP ("Low Ratio AlPases").
- 2** ; Seconde famille, de même R_F que la précédente (qui lui donne naissance).
Ce sont les IRP ("Intermediate Ratio AlPases").
- 3** ; HRP ("High Ratio AlPases").

SCHEMA 3C



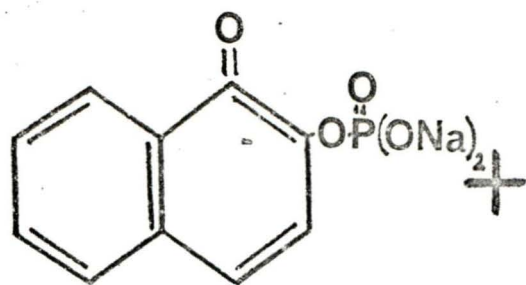
Pattern protéinique

SCHEMA 4

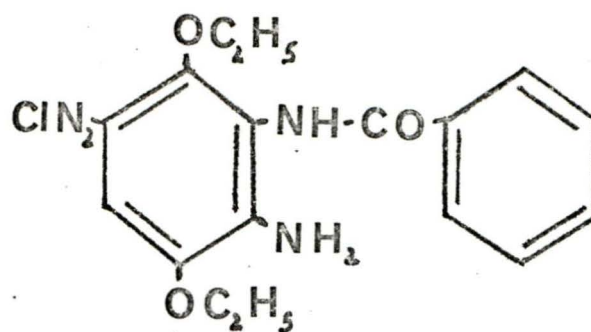
Pattern de l'ALPase
sérique, rapporté au
précédent

P : Isoenzyme placentaire
(souvent absente)

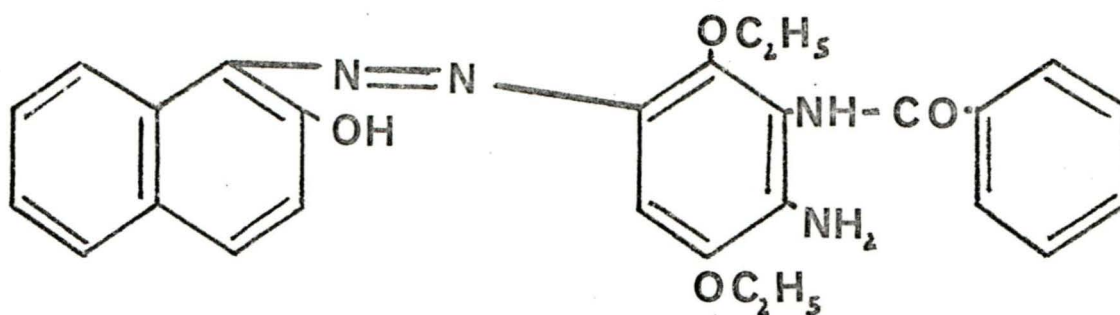
D : "Slow components".



Béta naphthyl phosphate
(Sel disodique)

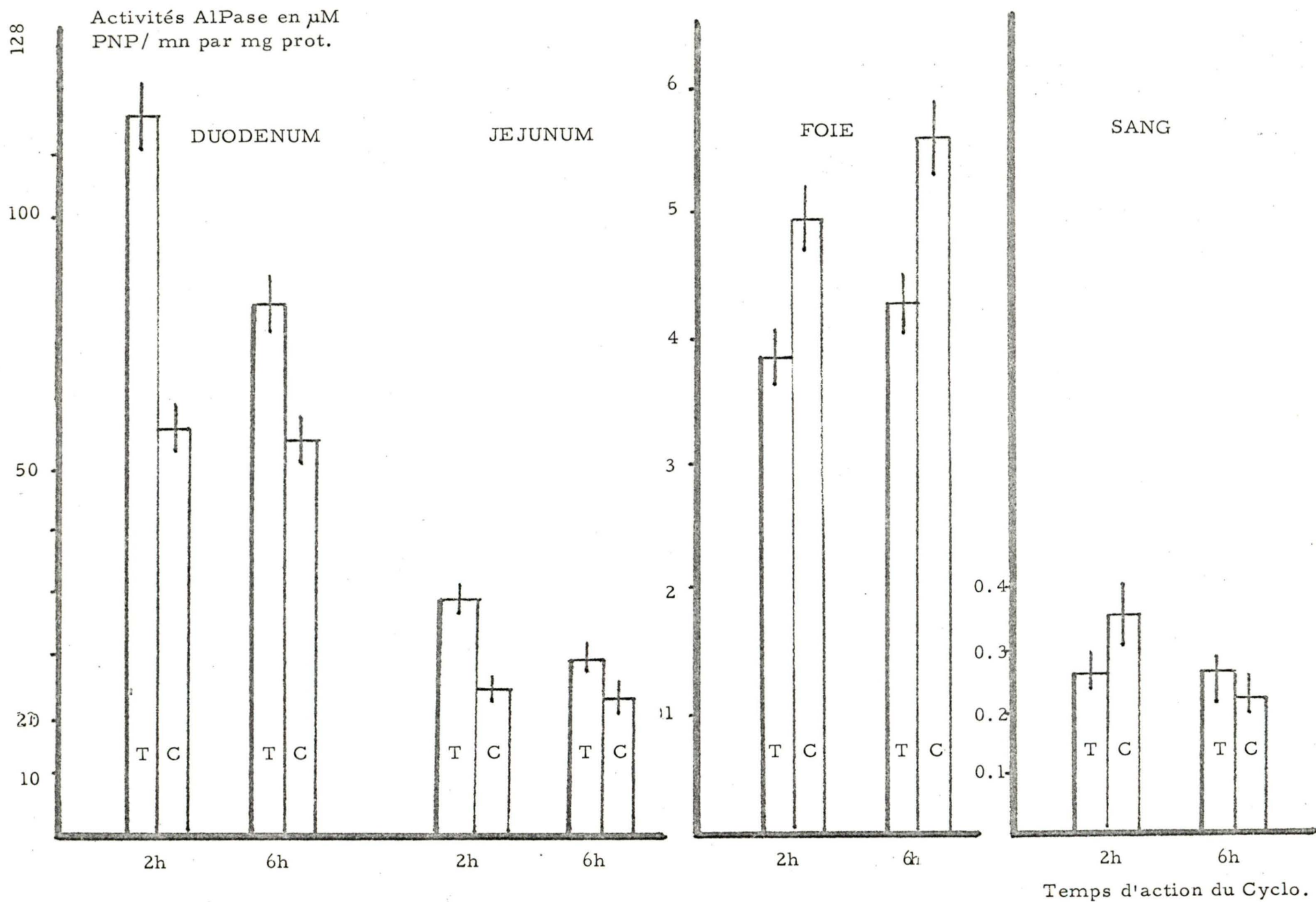


Fast blue BB
(Sel de Diazonium)

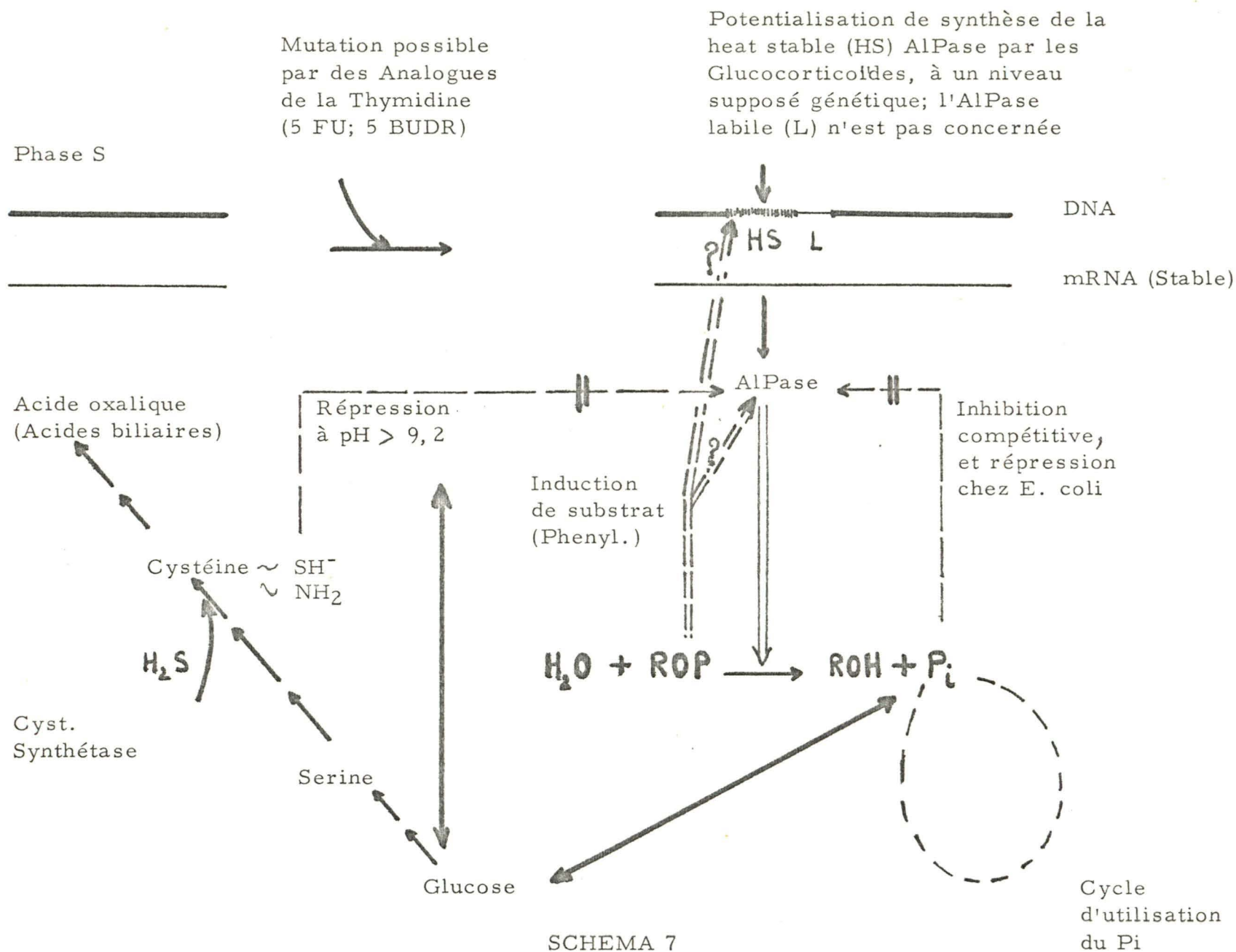


Complexe coloré
absorbant à 510 mμ

SCHEMA 5.



SCHEMA 6



SCHEMA 8

$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	Méthionine
$\text{HS-CH}_2\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	Cystelhe
$\text{HOOC-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	Cystine
$\text{HOOC-CH}_2\text{-NH-CO-}\underset{\text{CH}_2}{\underset{\text{SH}}{\text{CH}}}\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	Glutathion
$\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}_2\text{-COOH}}$	Glycine
$\text{CH}_3\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	Alanine
$\text{H}_2\text{N(CH}_2\text{)}_4\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	Lysine
$\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_2\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	Ac. glutamique
$\text{CH}_3\text{-CH-}\underset{\text{CH}_3}{\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}}\text{-COOH}$	Valine
$\text{(CH}_3\text{)}_2\text{=CH-CH}_2\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	Leucine
$\text{HN=}\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	Arginine
$\text{HN=}\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	L Homoarginine

TABLEAUX

TABLEAU 1A

Milieu d'extraction	Tissus	Activités AlPase en μ moles PNP/ mn/mg prot
Héparine Saline	Sérum Sérum	$0,24 \pm 0,028$ $0,24 \pm 0,028$
H ₂ O puis Butanol	Foie Duod Duod 3j Duod NF Jej	$10,6 \pm 1,1$ $96,4 \pm 9,4$ $92,7 \pm 9,2$ $118,6 \pm 12,7$ $23,4 \pm 2,5$
H ₂ O	Duod	$12,3 \pm 1,13$
Sucrose (0,25 M) puis Butanol	Foie Duod Jej	$4,1 \pm 0,40$ $97,4 \pm 9,44$ $25,4 \pm 2,70$

Duod 3j = Extrait duodéal dosé après 3 jours de congélation à -20°C .

Duod NF = Duodénum extrait chez des souris n'ayant pas subi les 12 heures de jeûne réglementaire (NF pour non fasting).

TABLEAU 1B

Stades d'extraction dans l'eau puis le butanol		Activité AlPase en μmoles PNP/mn/mg prot.	Indice de purification
Premiers culots réhomogénéisés dans H ₂ O	Duod	9,2 ± 0,89	
	Jej	5,4 ± 0,53	
	Foie	0,5 ± 0,04	
Seconds culots réhomogénéisés	Duod	12,5 ± 1,23	0,36
	Jej	6,9 ± 0,67	0,278
	Foie	0,7 ± 0,06	0,40
Phase aqueuse finale	Duod	120 ± 11,7	12,8
	Jej	42 ± 4,13	6,8
	Foie	3,1 ± 0,29	5,2

TABLEAU 2

Substrats ($2.10^{-3}M$)	Tissus	Activités ALPase en μ moles PNP (respt. Pi)/mn/mg protéine					
		Avant dialyse					
		AN	A + L $\%$	Variation	AN	A + L $\%$	Variation
PNPP	Duod	114	62.5	-45%	165 \pm 15.9	85 \pm 8.1	-49%
	Jéj1	34.7					
	Jéj	39.2	23.8	-39%	43.6 \pm 4.18	27.2 \pm 2.6	-37.8%
	Jéj2	42.1					
	Iléon	25.1					
	Foie	4.95	2.84	-42.5%	3.45 \pm 0.31	3.45 \pm 0.31	-
	VB	1.12					
	Sang	0.29	0.18	-38%	0.21 \pm 0.027	0.19 \pm 0.02	-
Phényl		Quantité de Pi présente dans les extraits non dialysés					
	Duod	380 \pm 40			189 \pm 17.2	99.5 \pm 9.1	-47.5%
	Jéj	370 \pm 40			34.1 \pm 3.2	24.75 \pm 2.3	-27.4%
	Foie	300 \pm 28			9.35 \pm 0.87	9.35 \pm 0.87	-
	Sang	80 \pm 10			-	-	-
Béta	Duod				14.85 \pm 1.4	8.50 \pm 0.81	-43%
	Jéj				4.86 \pm 0.4	3.58 \pm 0.36	-26.3%
	Foie				2.2 \pm 0.19	1.40 \pm 0.13	-36%
	Sang				-	-	-
ratio Phényl	Duod				12.7	11.8	-
Béta	Jéj				7.0	6.9	-

TABLEAU 3

Unités d'activité enzymatique	Substrats	Tissus	Régimes		
			Diète totale	Diète hydrolysée	Variation
Millimicromoles de dipeptide hydro-lysé par minute et par mg de protéine	Gly-L-Leu	Duod	562 \pm 36	570 \pm 31	-
		Jéj ₁	990 \pm 54	1020 \pm 56	-
		Jéj ₂	1210 \pm 67	1405 \pm 77	+16%
	Gly-L-Val	Duod	373 \pm 20	374 \pm 20	-
		Jéj ₁	670 \pm 37	684 \pm 38	-
		Jéj ₂	998 \pm 55	1010 \pm 55.5	-
Millimicromoles de PNP libéré/mn/mg prot.	PNPP	Duod	8.75 \pm 0.82	9.05 \pm 0.88	-
		Jéj ₁	2.87 \pm 0.21	3.30 \pm 0.30	+15%
		Jéj ₂	4.21 \pm 0.41	4.21 \pm 0.061	0%
		Sang	0.24 \pm 0.031	0.24 \pm 0.031	0%

Série de 2 x 6 souris non à jeûn.

Jéj₁ = 1ère partie du jéjunum.

Jéj₂ = seconde partie.

TABLEAU 4

Unités d'activité enzymatique	Substrats	Tissus	Régimes		
			Diète totale	Diète hydrolysée	Variation
Millimicromoles de dipeptide hydrolysé /mn/mg prot.	Gly-L-Leu	Jéj ₂	1277 ± 70	1535 ± 84	+ 20%
	Gly-L-Val	Jéj ₂	1042 ± 57	1300 ± 71	+ 25%
Millimoles de PNP libéré/mn/mg prot.	PNPP	Duod	6.65 ± 0.61	4.91 ± 0.45	- 26%
		Jéj ₂	2.44 ± 0.21	1.90 ± 0.18	- 22%
		Foie	1.17 ± 0.1	0.927 ± 0.09	- 21%
		Sang	0.242 ± 0.029	0.240 ± 0.029	0%

Série de 2 x 9 souris à jeun.

Jéj₂ = dernière partie du jéjunum (pre coccale).

TABLEAU 5

Niveau des bandes coupées dans le gel	Activités en unités de D.O.	
	Phenyl	Beta
"Slow components"	0,015	-
HRP (migration moyenne)	0,041	-
IRP (migration rapide)	0,016	-

"Slow components"; traces d'AlPase de très faible migration
(Bande 3)

(R_F minimum).

HRP; (Bande 2) "High ratio AlPases" (selon F. MOOG);
bande principale de R_F intermédiaire dé-
composable, au moins, en 2 isoenzymes.

IRP; (Bande 1) "Intermediate ratio AlPases";
bande de haut R_F .

TABEAU 6

Races des souris	Tissus	Activité AlPase en mmoles PNP/mn/mg protéine					
		Témoins			Traitées (huile de maïs)		
		AN	A + L _p	Variation	AN	A + L _p	Variation
ICR	Duodénum	126 ± 11.7	70 ± 6.4	-44.3%	264 ± 25	104 ± 9.5	-61%
	Foie	8.2 ± 0.78	7.4 ± 0.67	-	17.5 ± 1.67	16.5 ± 1.58	-
SWR	Duodénum	202 ± 20	100 ± 9.4	-50.5%	310 ± 29	150 ± 14.2	-52%
	Foie	10.4 ± 0.94	9.8 ± 0.87	-	21.2 ± 1.97	19.4 ± 1.84	-

AN : Activité normale

A + L_p : Activité enregistrée en présence de L phénylalanine (L_p) 5 mM

TABLEAU 7

Tissus	Activité AlPase en μ moles PNP/min/mg protéine					
	a C_1	b Ex_1	Variation	c C_2	d Ex_2	Variation
Duodenum	^e 115.5 \pm 10.2	66.1 \pm 6.4	-43%	85.7 \pm 7.9	63.5 \pm 6.2	-28%
Jejunum	37.5 \pm 5.3	23.1 \pm 4.7	-38%	27.7 \pm 4.9	22.7 \pm 4.3	-18.5%
Foie	3.84 \pm 0.37	4.86 \pm 0.45	+27%	4.25 \pm 0.4	5.58 \pm 0.5	+31%
Sang	0.258 \pm 0.031	0.354 \pm 0.04	+27%	0.258 \pm 0.031	0.220 \pm 0.027	-

(a) Animaux contrôles au jeûne pendant 12 heures.

(b) Animaux traités au cycloheximide (40 μ g/g) et sacrifiés 2 h. après injection.

(c) Animaux contrôles au jeûne pendant 18 heures.

(d) Animaux traités au cycloheximide 4 h. après une première injection et sacrifiés 2 h. après la seconde (40 μ g/g).

(e) Chaque chiffre représente la moyenne sur 20 animaux.

TABLEAU 8

Patients	Sexe	Activité AlPase en μ moles PNP/mn/mg de protéine		
		Avant 5 F. U.	Pendant 5 F. U.	Après 5 F. U.
No 1	M	$2,38 \pm 0,192$	$2,20 \pm 0,168$	$2,17 \pm 0,159$
No 2	M	$0,9 \pm 0,104$	$1,13 \pm 0,122$	$1,15 \pm 0,13$
No 4	M		$7,45 \pm 0,34$	$7,2 \pm 0,327$
No 5	M	$2,24 \pm 0,169$	$2,18 \pm 0,166$	$1,84 \pm 0,156$
No 6	M		$0,745 \pm 0,096$	$1,24 \pm 0,125$
No 7	F	$1,77 \pm 0,149$	$1,48 \pm 0,139$	$1,34 \pm 0,137$
No 8	M		$0,83 \pm 0,099$	$1,17 \pm 0,13$
No 9	F		$2,81 \pm 0,244$	$2,44 \pm 0,23$

TABLEAU 9

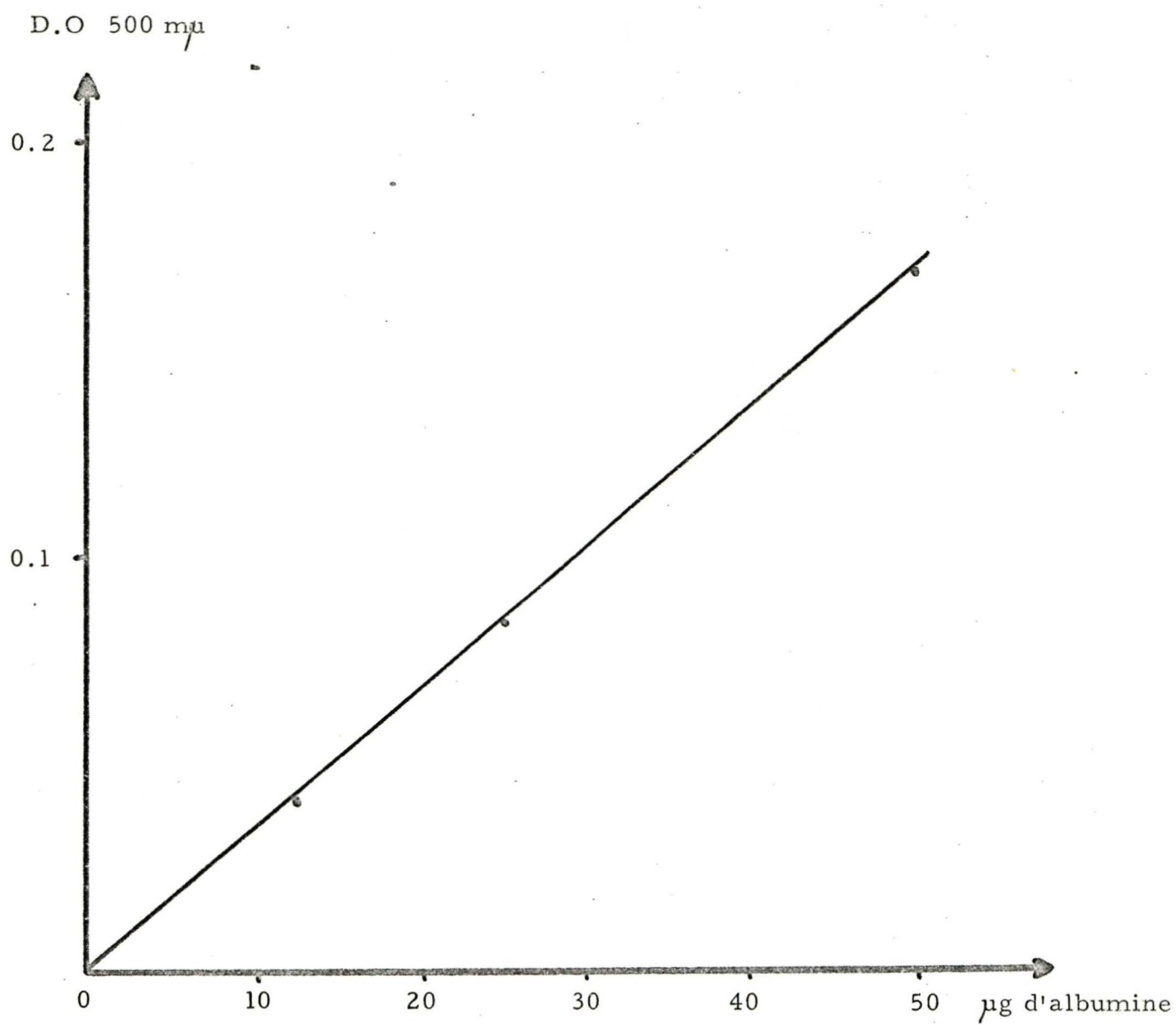
S = Concentrations de substrat en Mole	Activité AlPase duodénale en μ Moles PNP/mn/mg protéine				
	pH_{10}			$pH_{10,3}$	Variation*
	AN	A + L ψ	Variation		
10^{-2}	500 \pm 37	350 \pm 29	-30%	230 \pm 21	-54%
5 10^{-3}	245 \pm 22.5	174 \pm 16.6	-29%	95.5 \pm 9.3	-61%
2.5 10^{-3}	131 \pm 12.7	94.3 \pm 9.2	-28%	42 \pm 3.9	-68%
1.25 10^{-3}	70 \pm 6	58.8 \pm 5.3	-16%	23.3 \pm 2.1	-67%
10^{-3}	66.7 \pm 5.7	51.4 \pm 4.8	-23%	22.4 \pm 2	-65%
5.0 10^{-4}	52 \pm 4.8	33.4 \pm 3.1	-36%	18.7 \pm 1.7	-64%

Variation*: Pertes d'activité enregistrées entre pH_{10} et $pH_{10,3}$

AN : Activité normale

A + L ψ : Activité obtenue en présence de L phénylalanine 5 mM

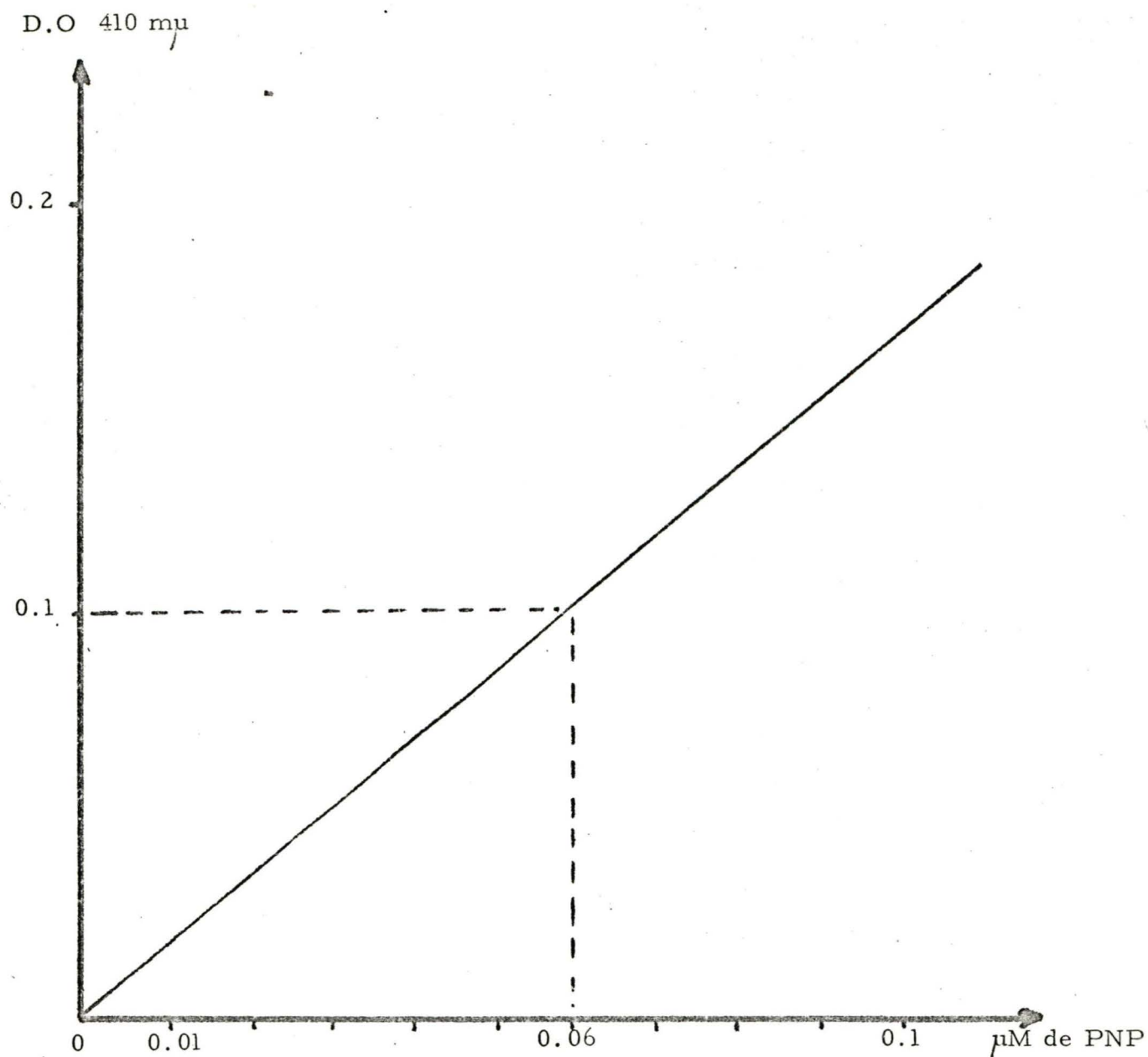
COURBES



Dosage des Proteines (LOWRY)

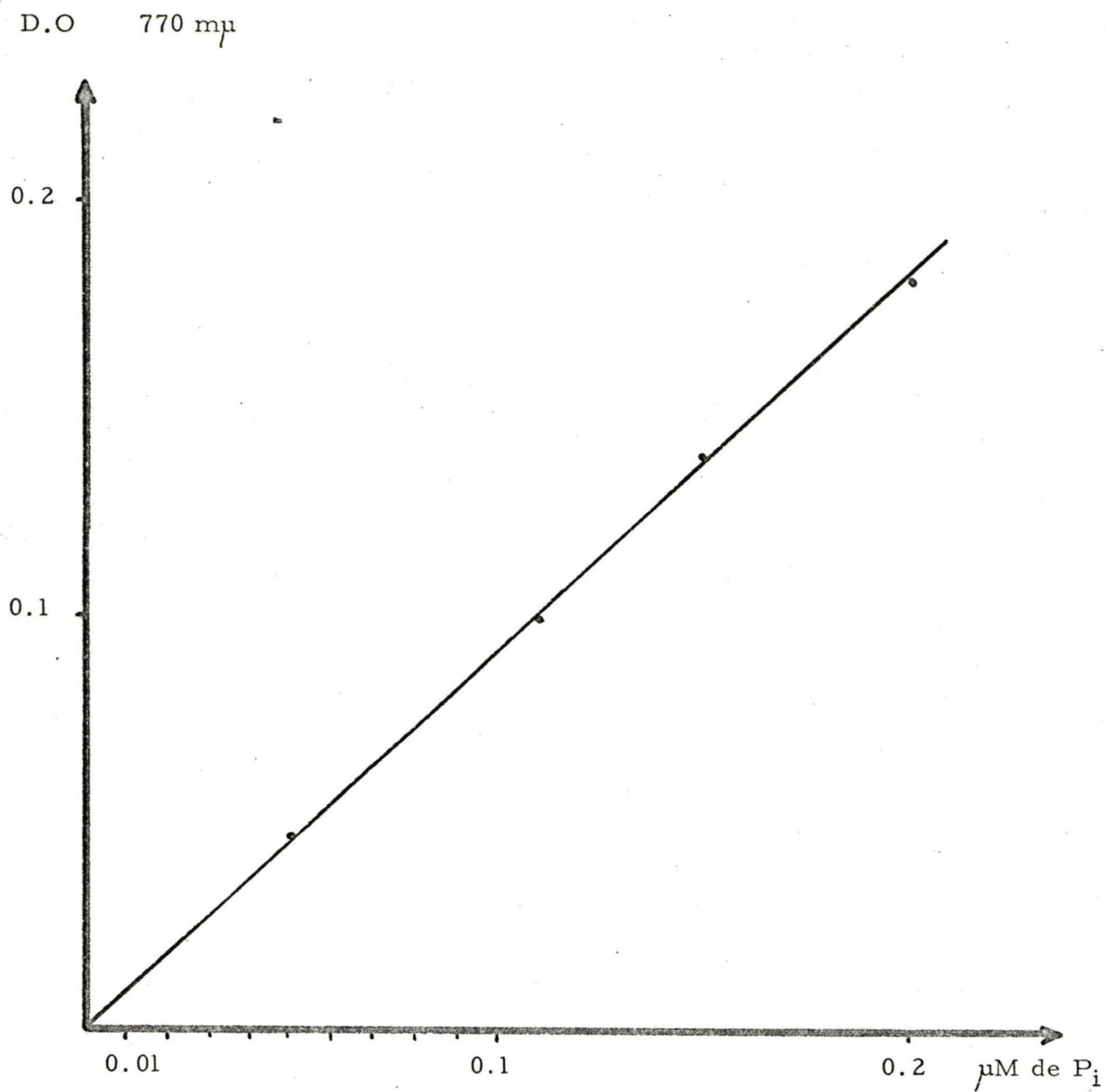
Courbe Etalon.

COURBE 1.



Dosage de l'AlPase à pH 10 et 37°C
dans le tampon carbonate bicarbonate.
Courbe Etalon.

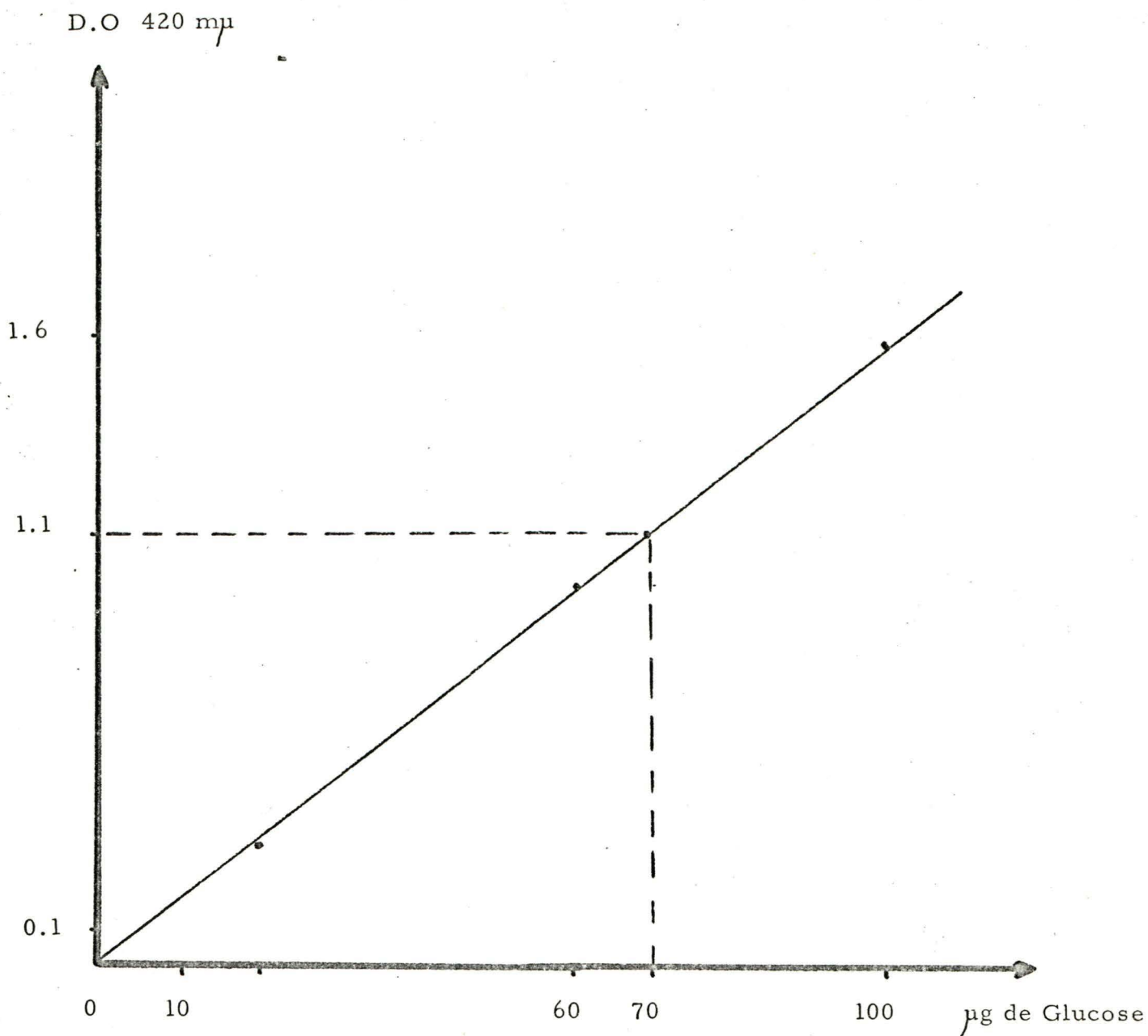
COURBE 2.



Dosage du phosphate inorganique (DRYER): pH 7.4

Courbe Etalon.

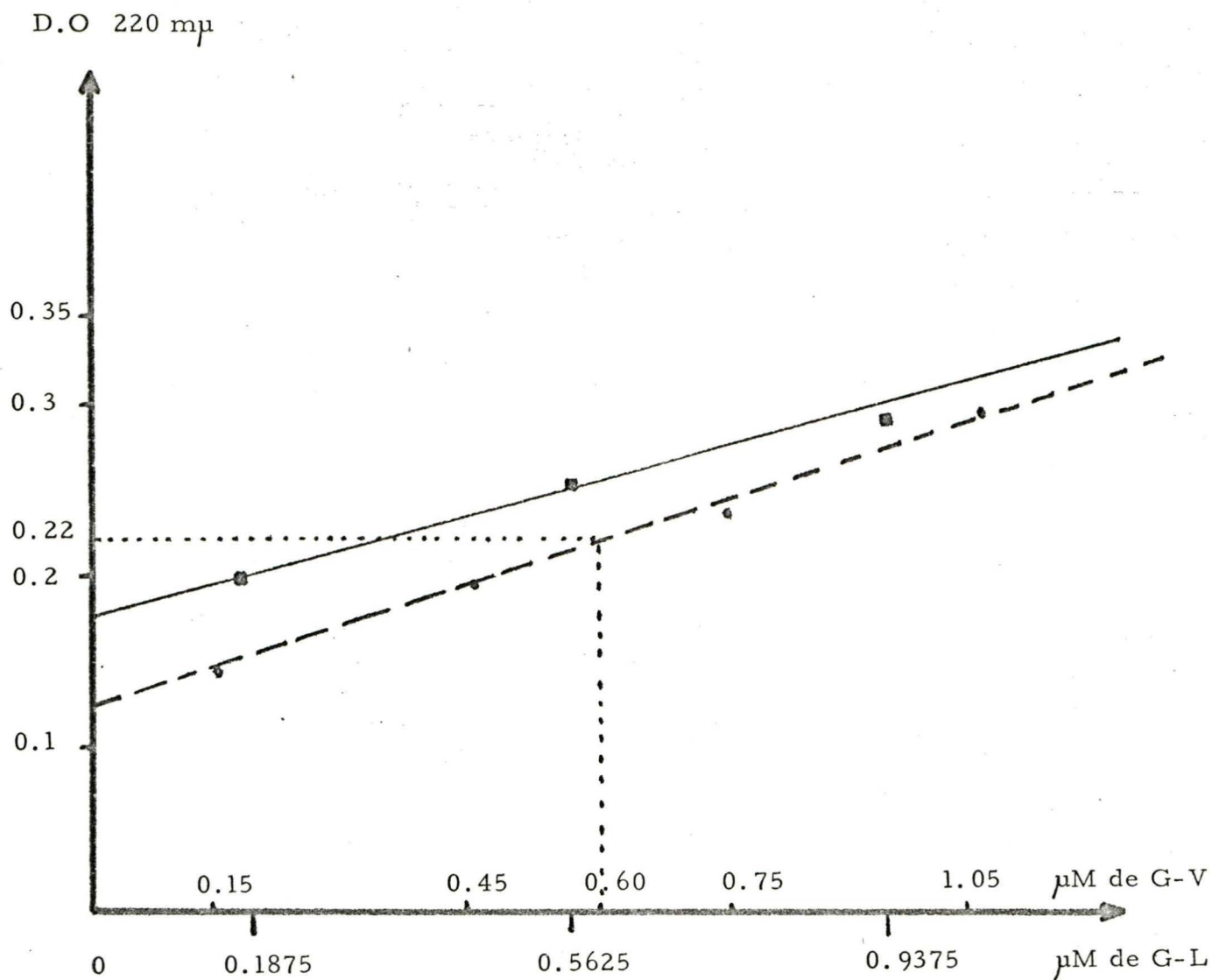
COURBE 3.



Dosage de la sucrase (DAHLQUIST): pH 7

Courbe Etalon.

COURBE 4.



Dosage des Dipeptidases (JOSEFSON) à pH 7.4

Courbes Etalons:

—■—■—■—

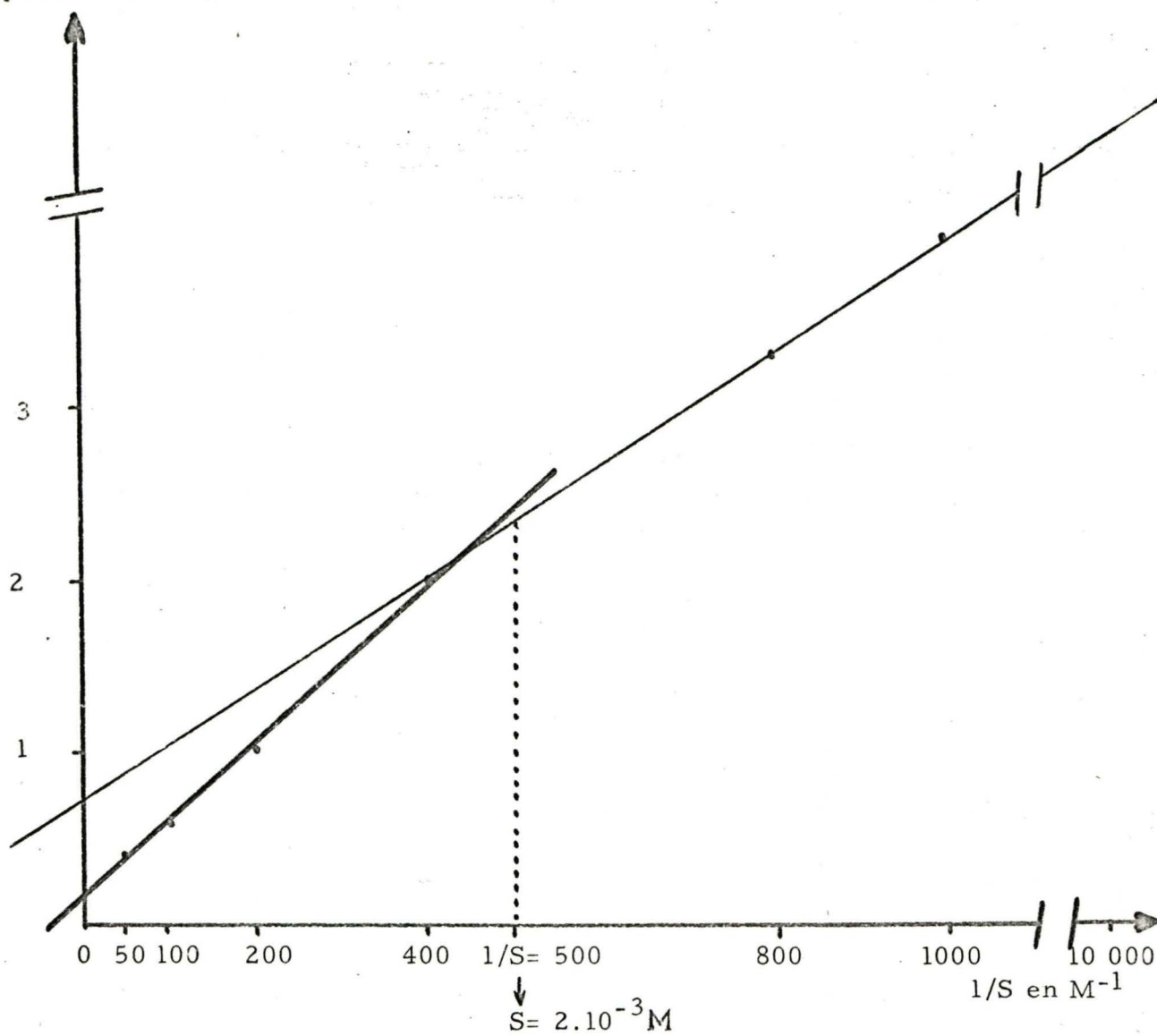
Pour le substrat Glycyl-L-Valine (G-V)

- - -■- - -■- - -■- - -■

Et pour le substrat Glycyl-L-Leucine (G-L)

COURBE 5.

$1/V$ en μM^{-1} PNP/ mn $^{-1}$
par ml $^{-1}$.



Cinétique(LINEWEAVER) de l'extrait duodéal sur PNPP (pH 10)



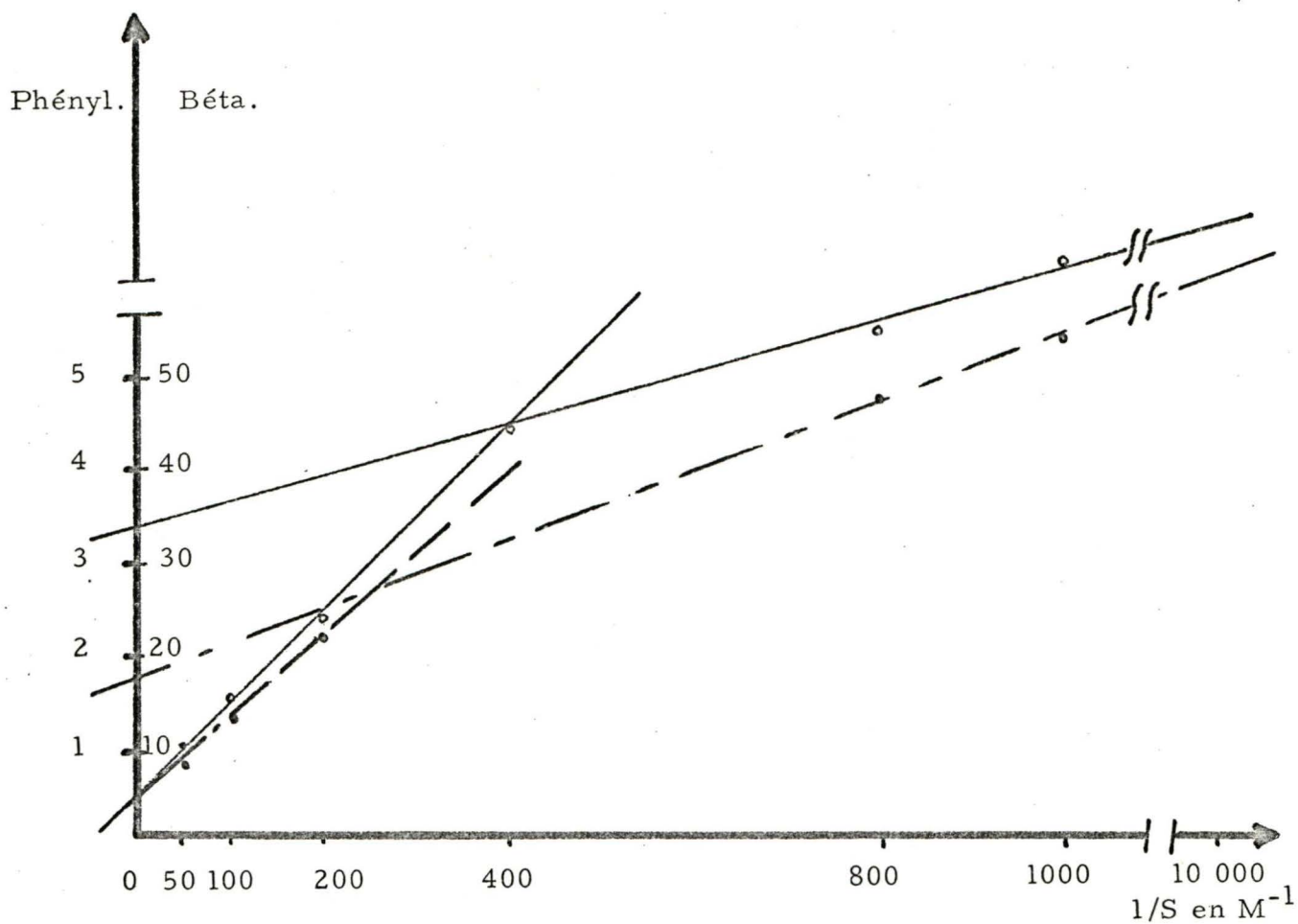
Courbe de faible spécificité Enz-Substrat.



Courbe de bonne spécificité.

COURBE 6.

$1/V$ en μM^{-1} PNP/ mn^{-1}
par ml^{-1} .



Cinétique de l'extrait duodénal sur:



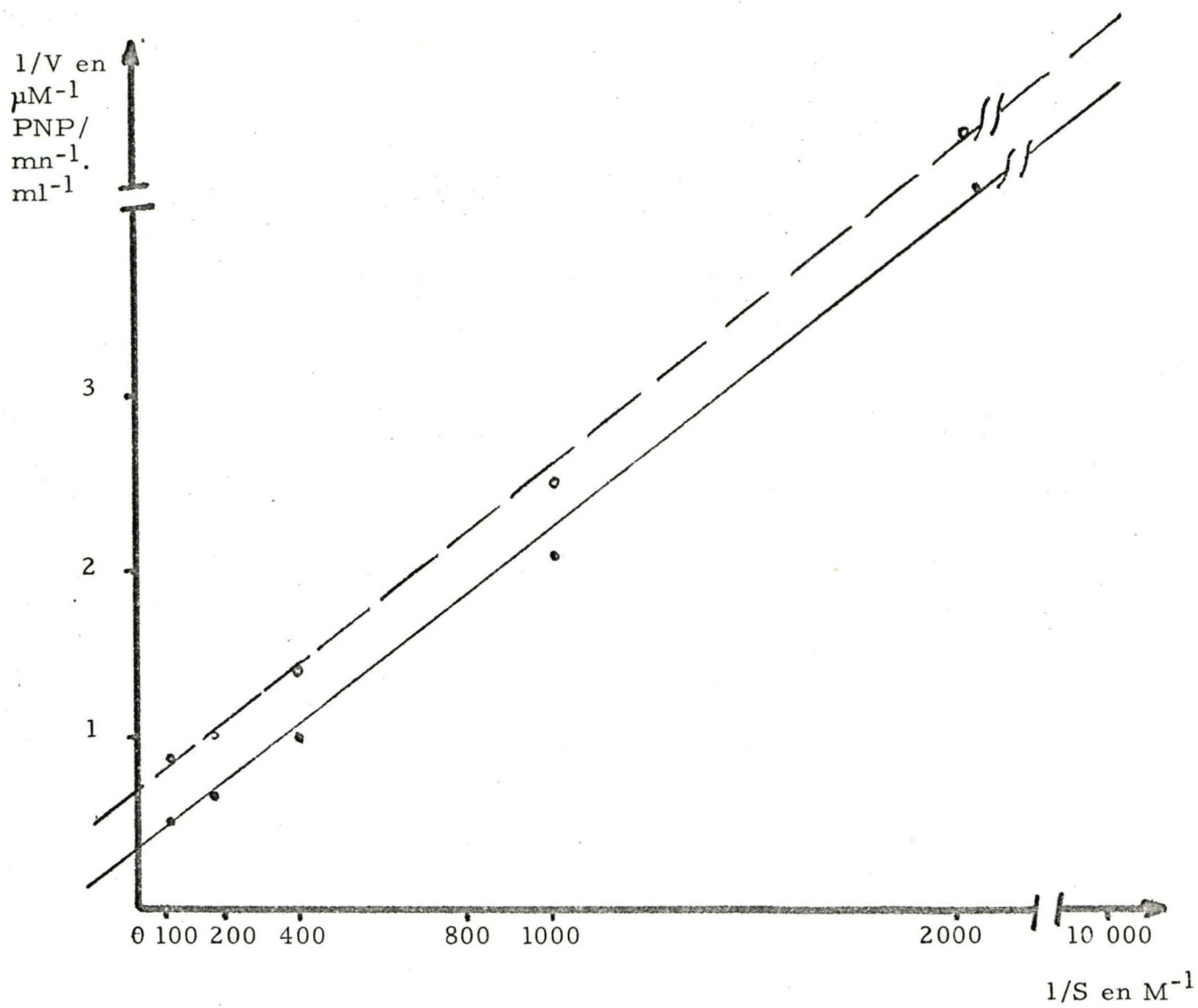
Phényl phosphate (Phényl.)



Bétaglycéro phosphate (Béta.)

pH: 10.

COURBE 7.



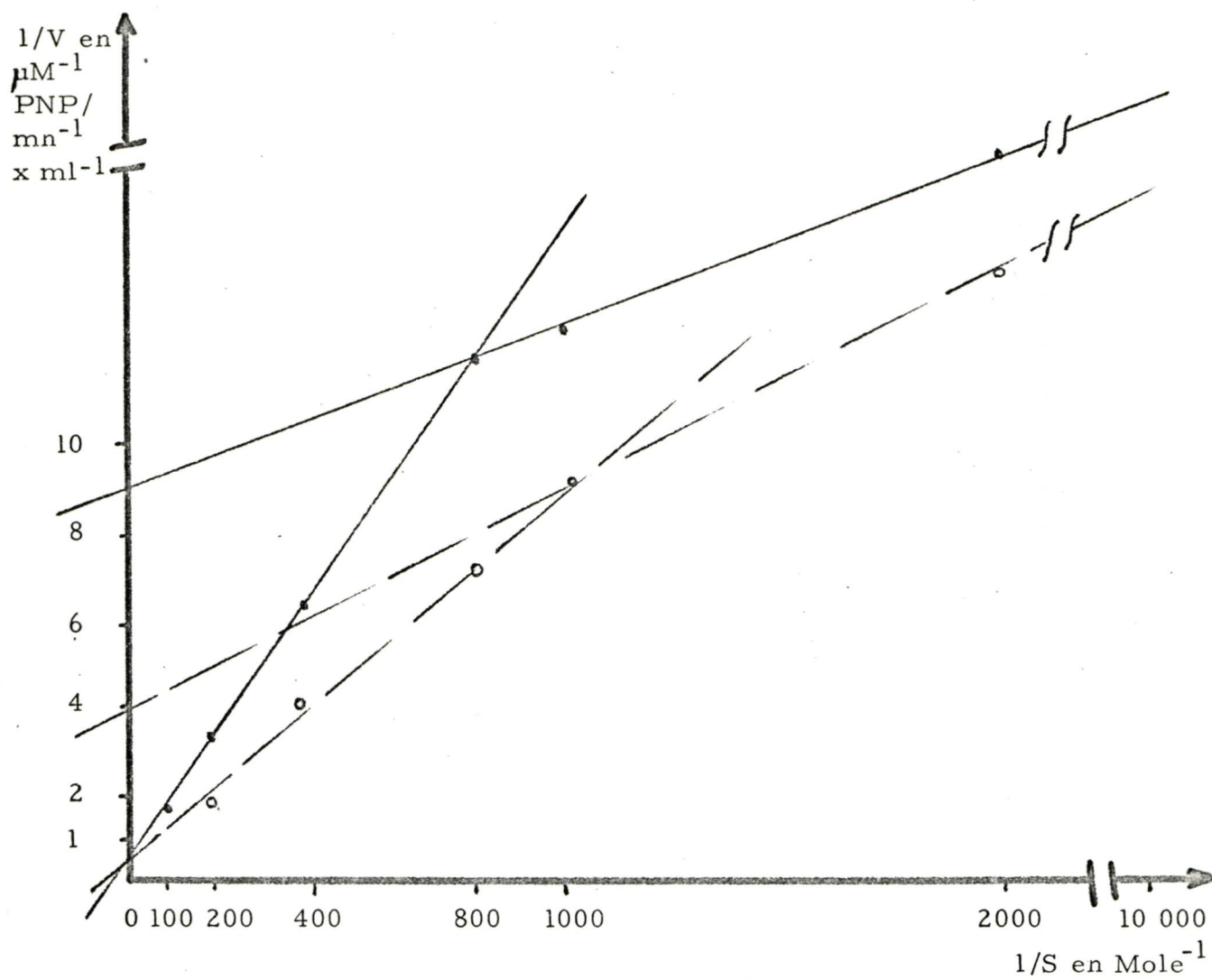
Cinétique de l'extrait duodénal sur PNPP (pH 9.2)



Activité normale

Activité en présence de L Phényl alanine.

COURBE 8.



Cinétique de l'extrait duodéal sur PNPP (pH 10.3)

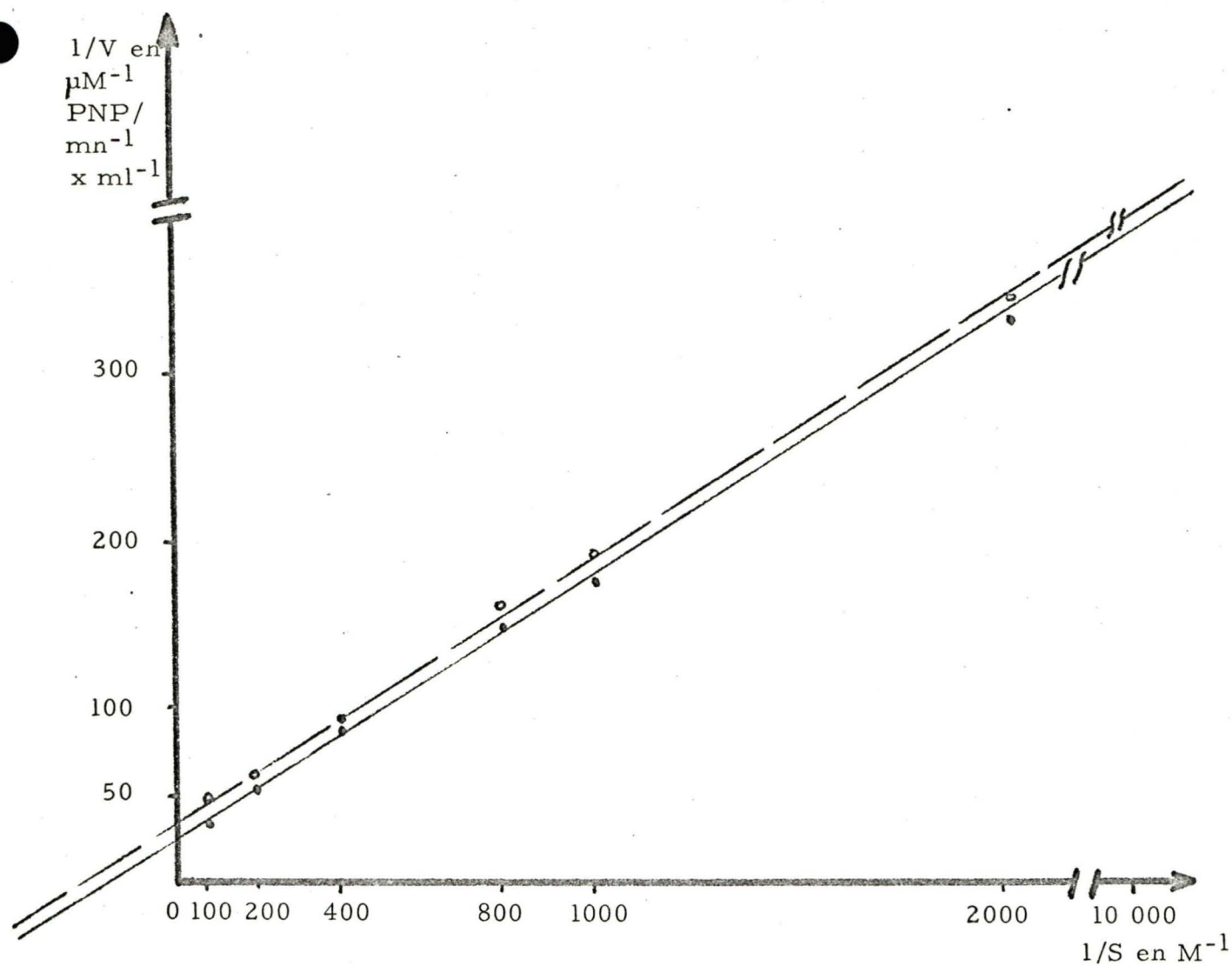
● —

Activité normale.

○ —

Activité en présence de L Phényl alanine.

COURBE 9.



Cinétique de l'extrait Hépatique sur PNPP (pH 10)

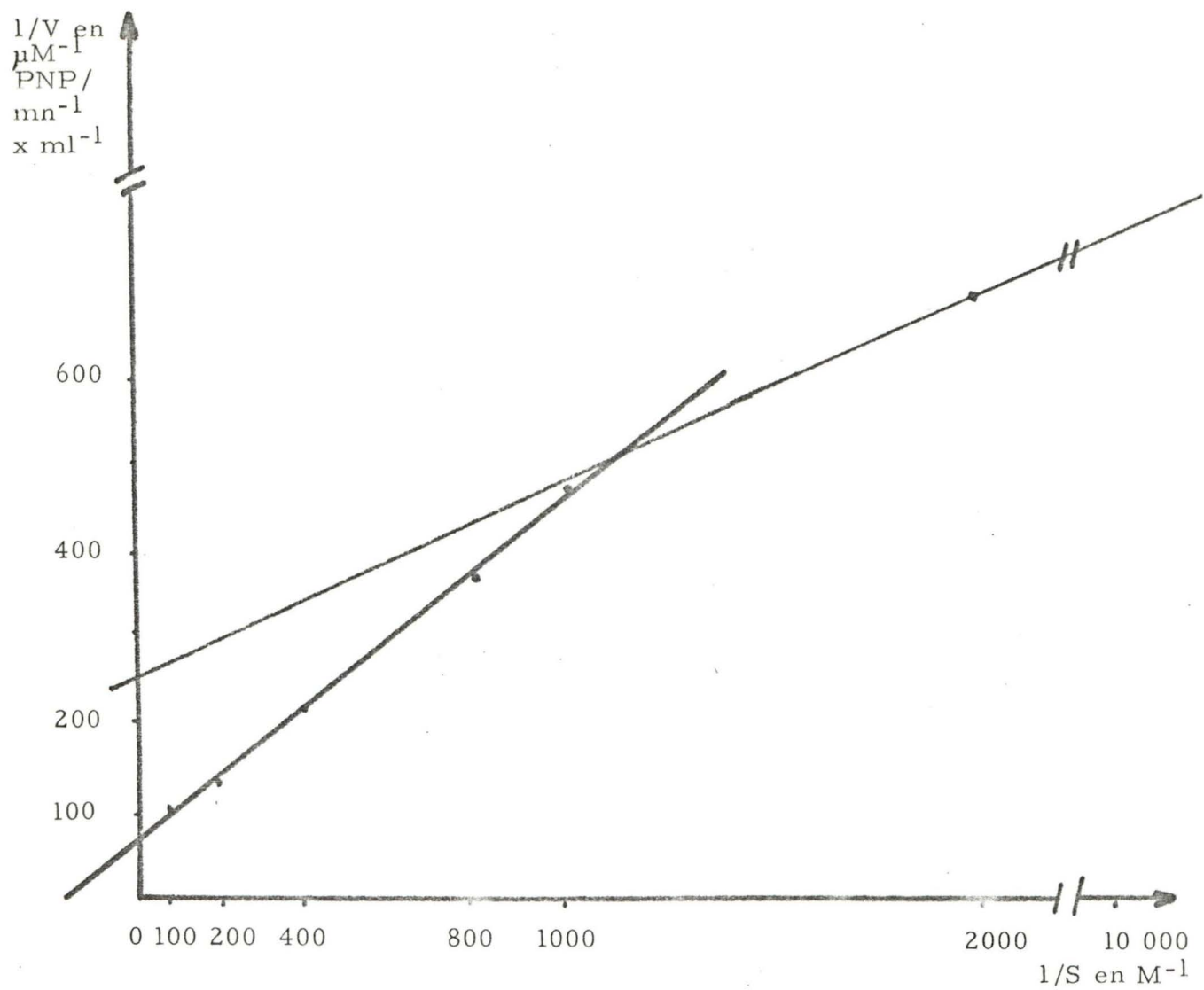
—

Activité normale.

- - -

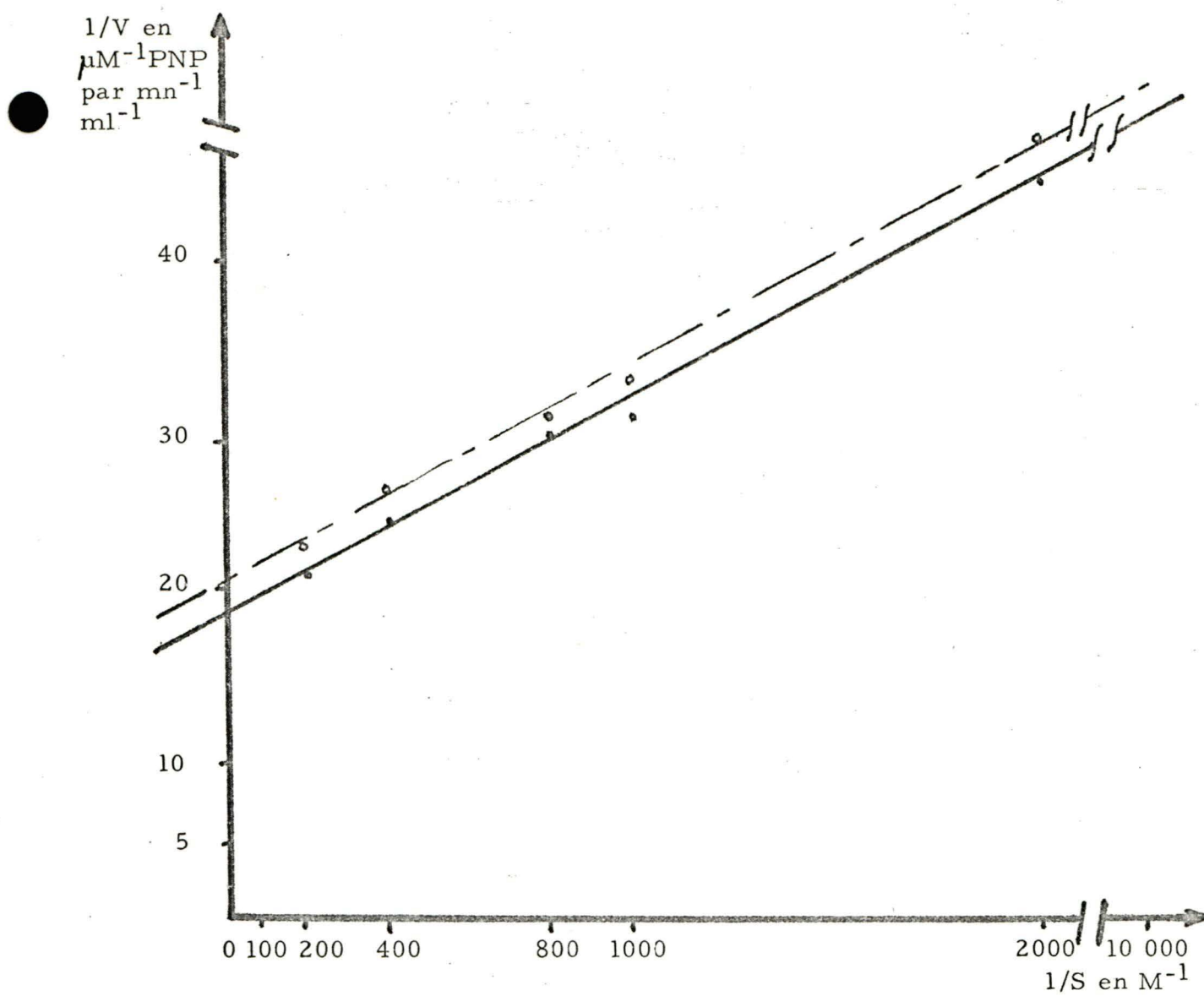
Activité en présence de L Phényl alanine.

COURBE 10A.



Cinétique de l'extrait Hépatique sur PNPP
à pH 10.3

COURBE 10 B.



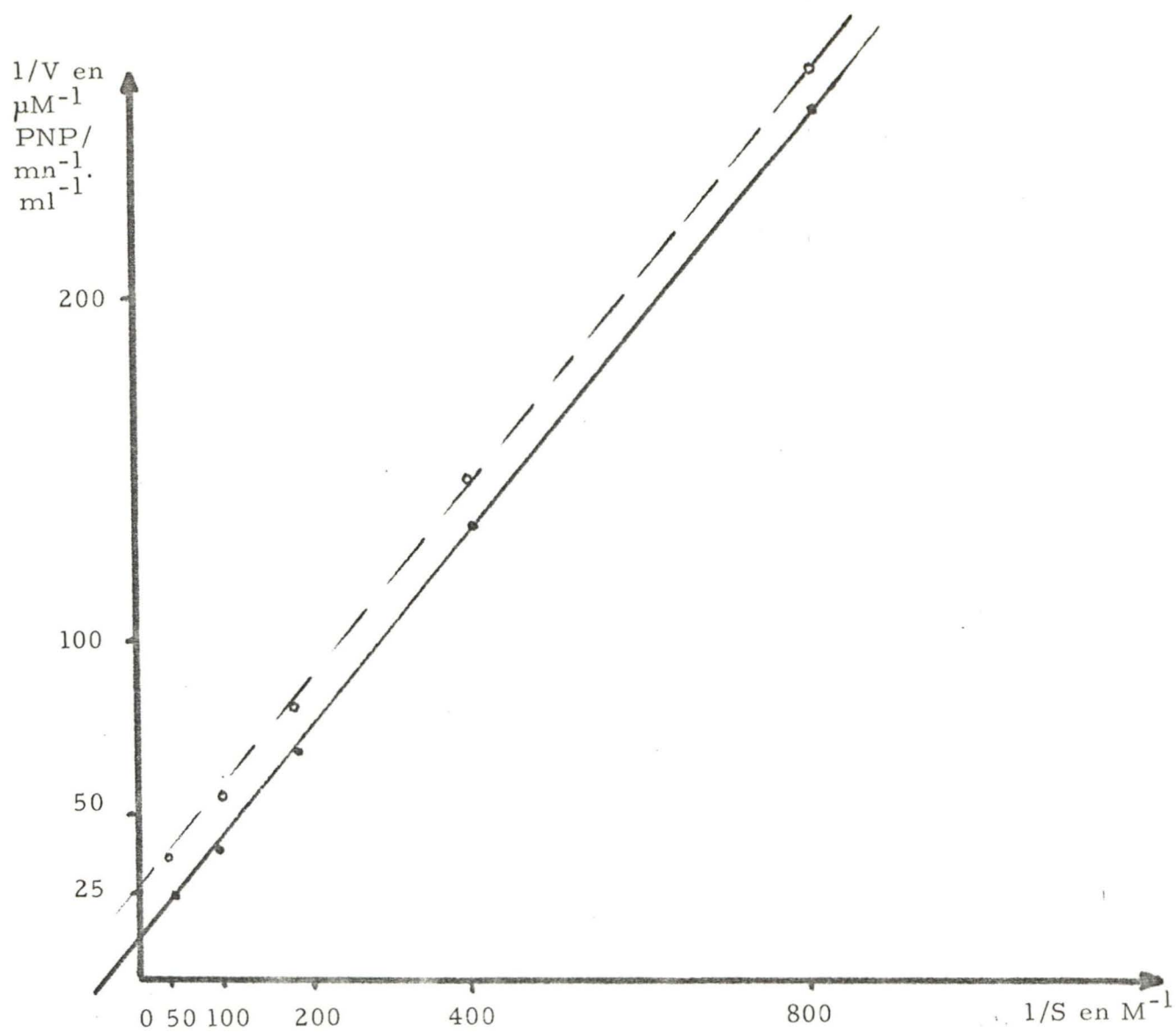
Cinétique de l'extrait Hépatique sur PNPP (pH 9.2)



Activité normale

Activité en présence de L Phényl alanine.

COURBE 11.



Cinétique de l'extrait sérique sur PNPP (pH 9.2)

—●—

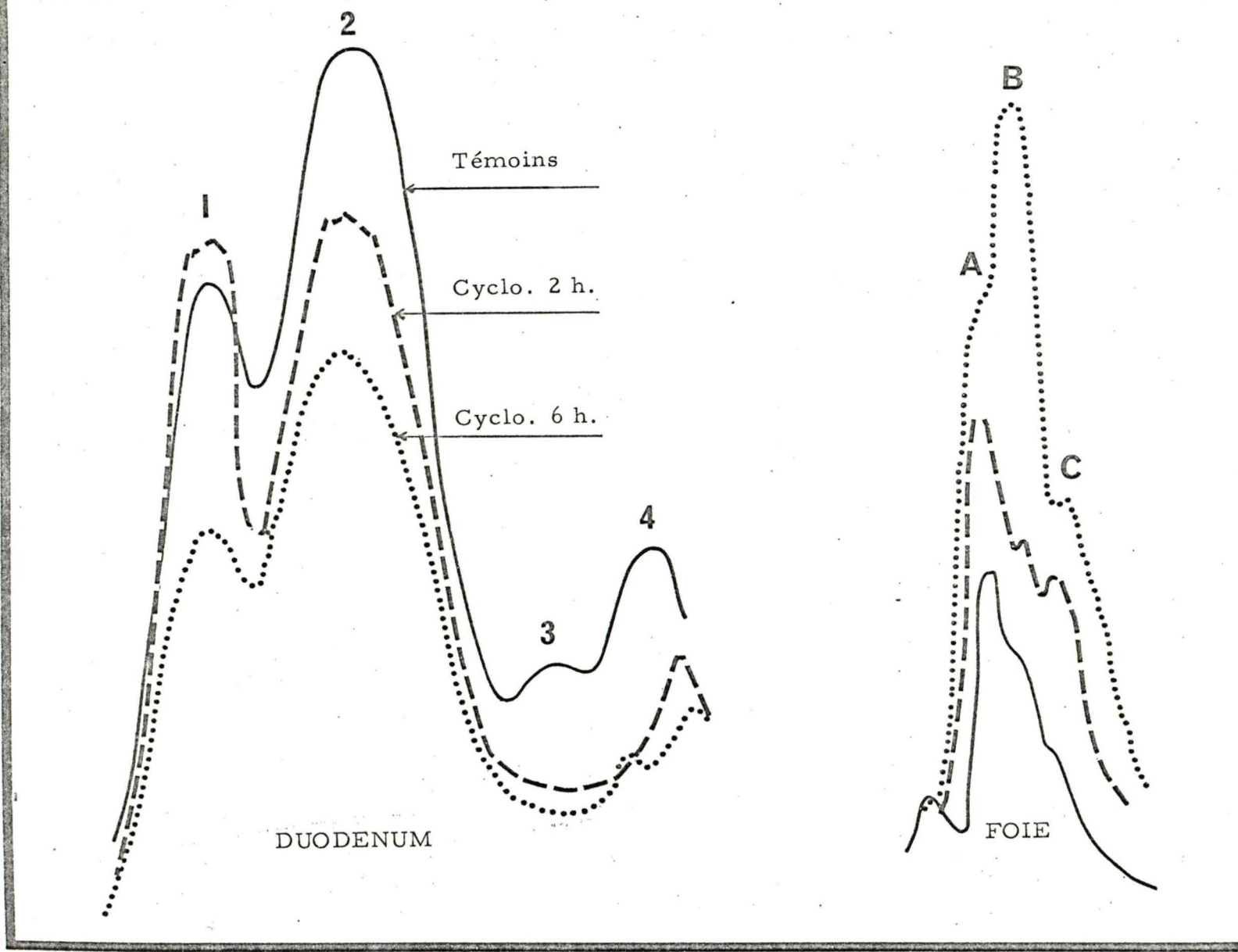
Activité normale

—○—

Activité en présence de L Phényl alanine.

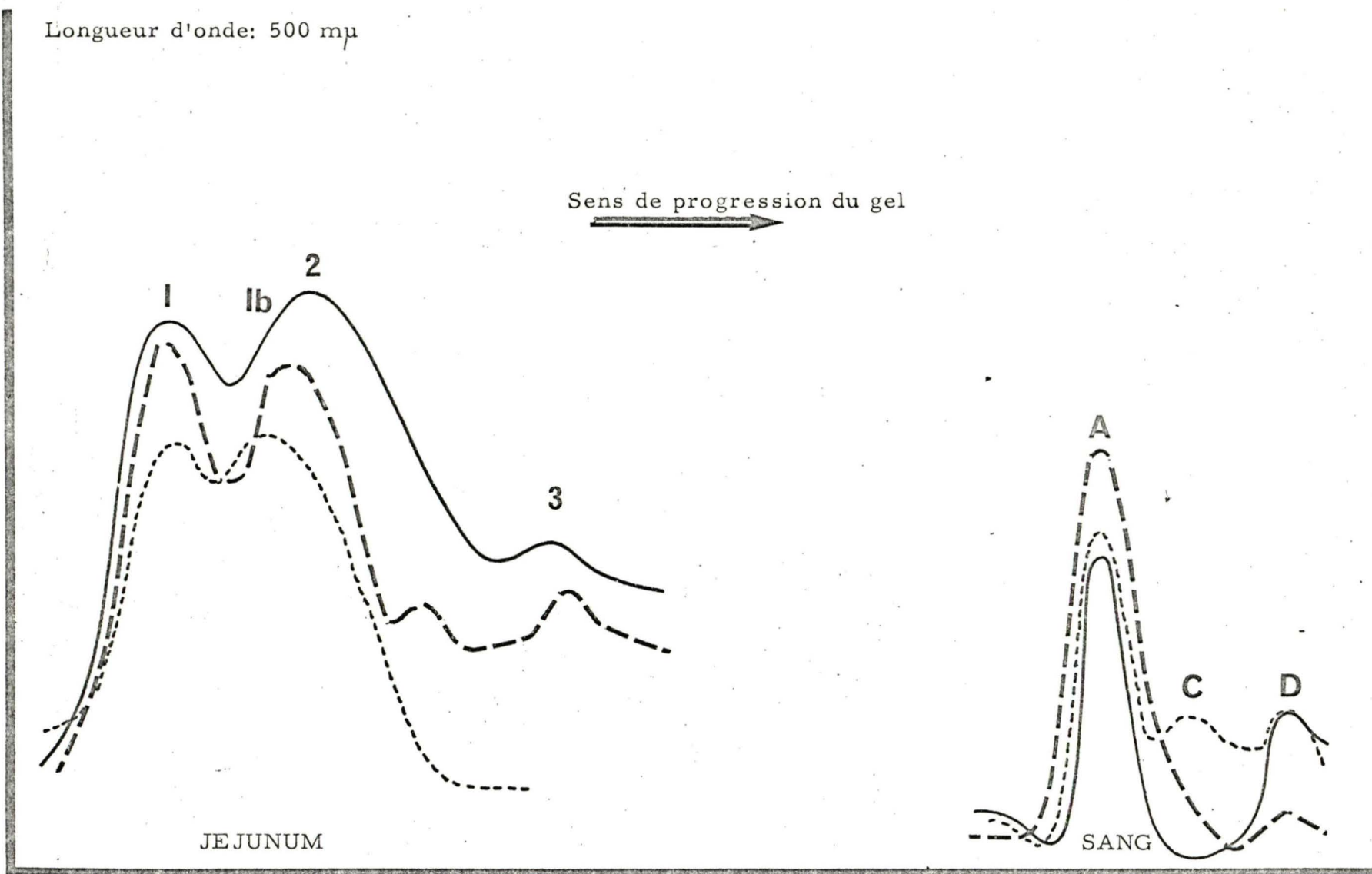
COURBE 12

Longueur d'onde: 500 mμ



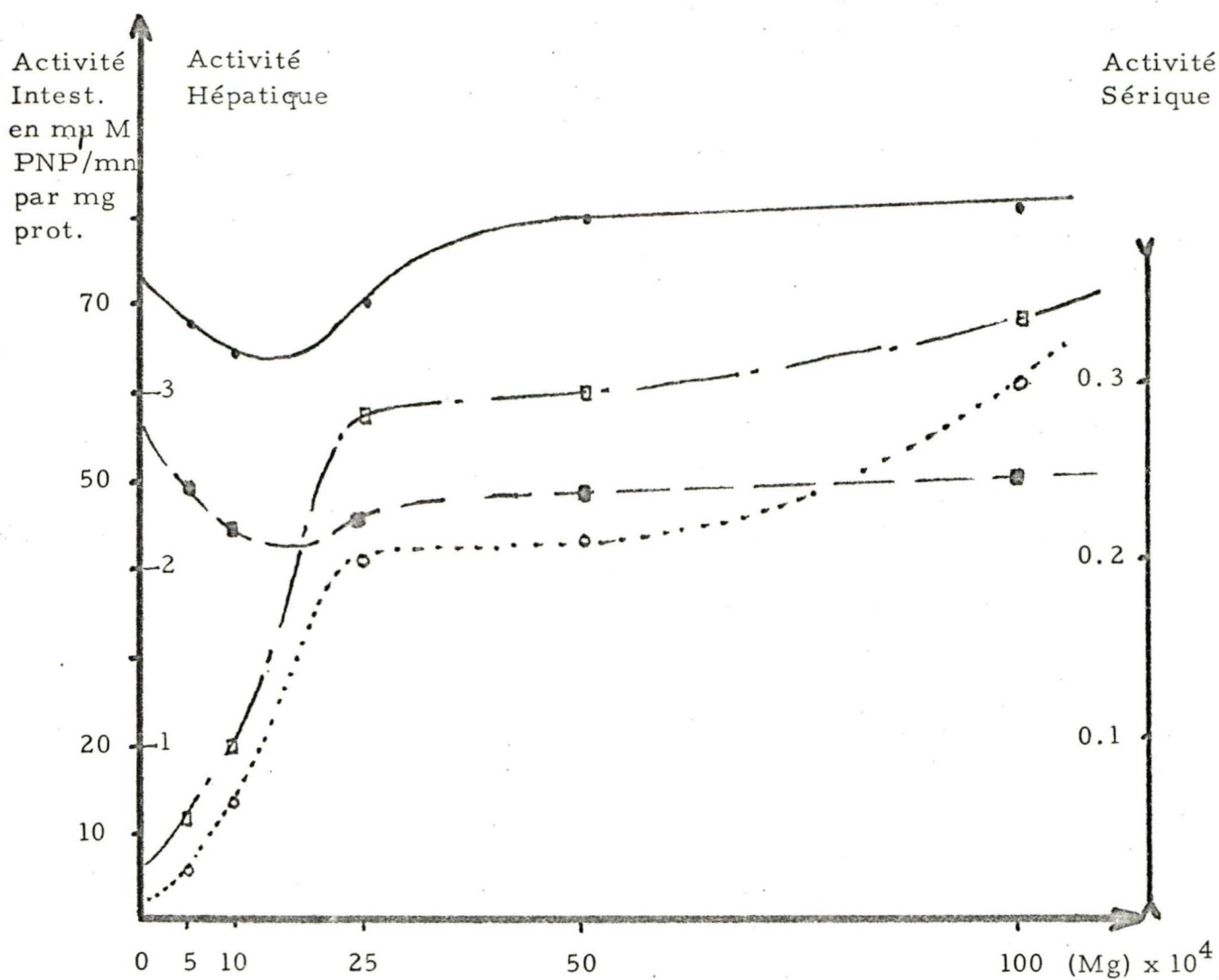
COURBE 13 A.

Vitesse du Gel =
Vit. de l'enregistrement
= 1 IN. (2.5 cm)/Mn.



COURBE 13 B.

Vitesse:
1 IN./Mn.



Variation, en fonction de la concentration de Mg exogène de:

- L'activité duodénale normale.
- L'activité duodénale en présence de L Phényl alanine.
- L'activité Hépatique.
- ...○... Et l'activité sérique.

COURBE 14.

Activité
AlPase en
mp M PNP
par mn x
mg prot.

Variation de l'activité duodénale, normale (—●—) et en présence de L Phényl alanine (—■—), en fonction de la force ionique du Tampon.

100

COURBE 15 A.

50

10

0.104 0.19 0.276 0.447 0.531

0.864

Force
ionique (I)

log. de
l'activité
duodénale
normale

-1

mp M
PNP/
mn par
mg prot

Variation de l'activité Hépatique normale en fonction de la force ionique du Tampon.

COURBE 15 B.

6

3

1

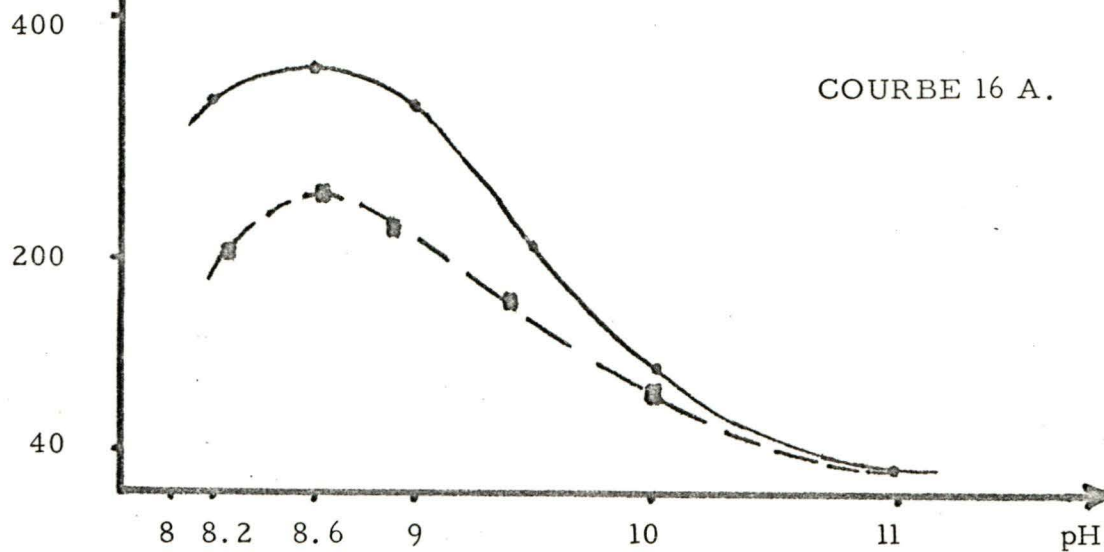
0.104 0.19 0.276 0.447 0.531

0.864

I

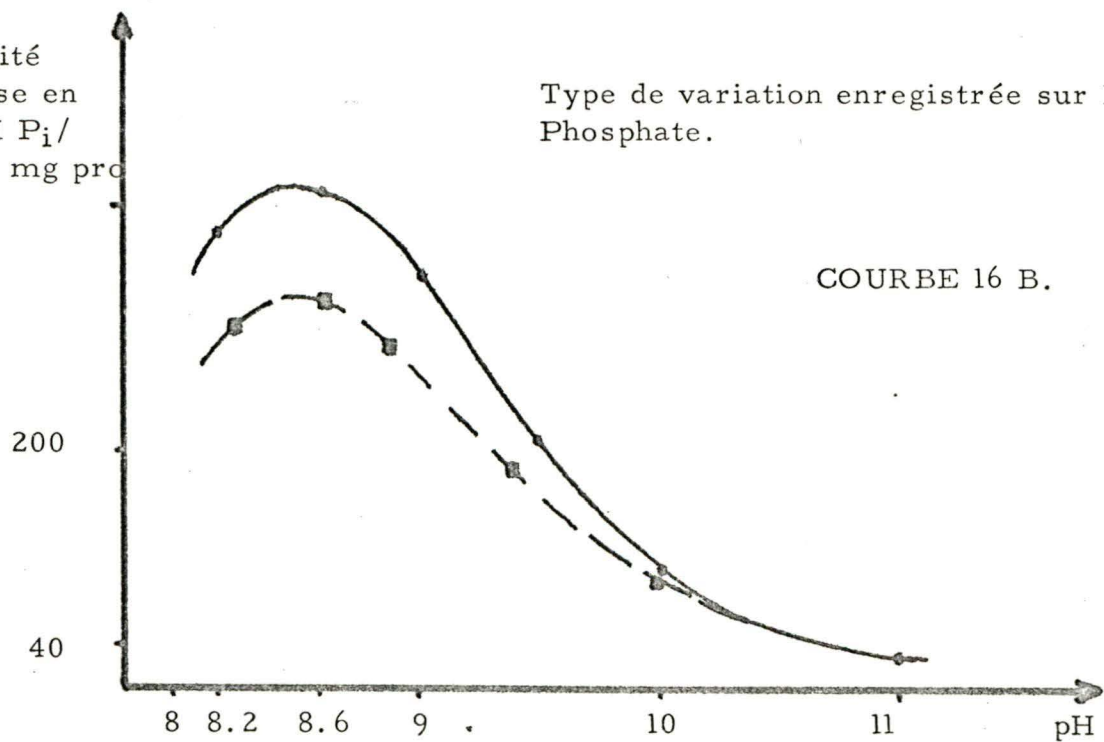
Activité
AlPase en
mp M PNP/
mn x mg prot.

Variation de l'activité duodénale normale
(—•—), ou en présence de L Phényl ala-
-nine (—■—), en fonction du pH du
Tampon, sur PNPP.

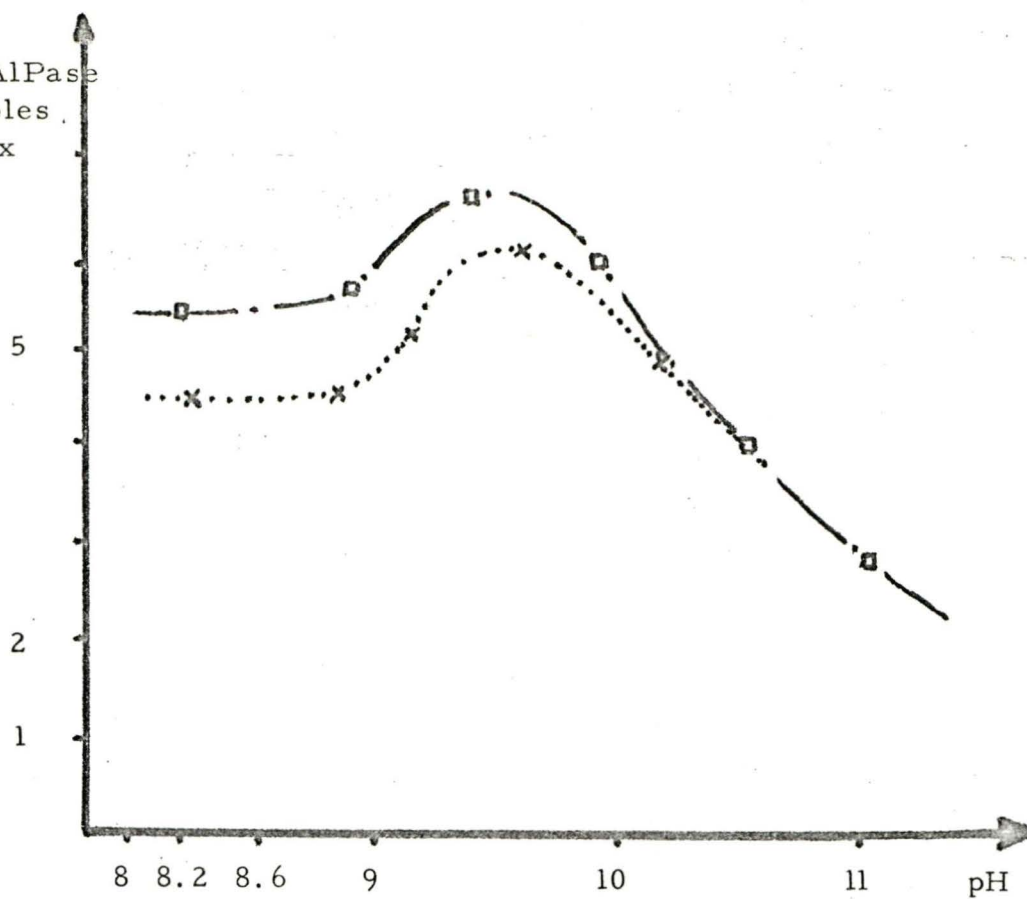


Activité
AlPase en
mp M P_i /
mn x mg prot.

Type de variation enregistrée sur Phényl
Phosphate.

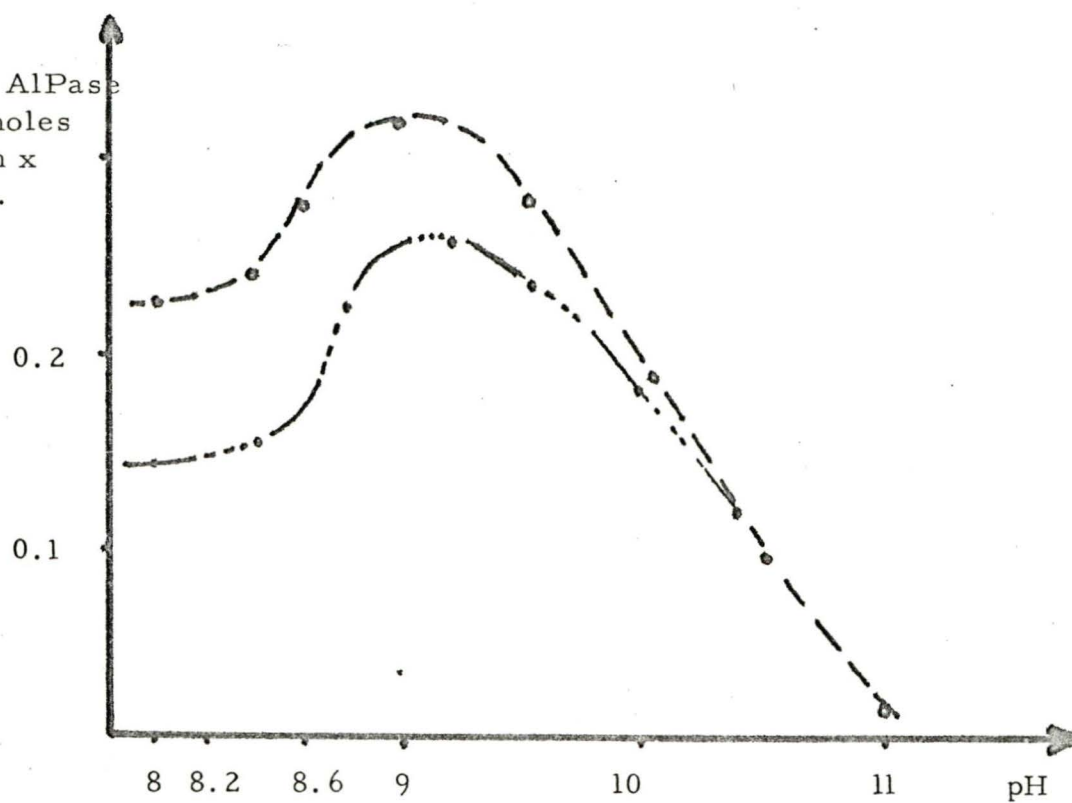


Activité AlPase
en μ moles
PNP/mn x
mg prot.



COURBE 17 A; FOIE.

Activité AlPase
en μ moles
PNP/mn x
mg prot.



COURBE 17 B; SANG.

PHOTOS



1



2



3



4

①

② A



1



2



3



4



5

② B



1



2

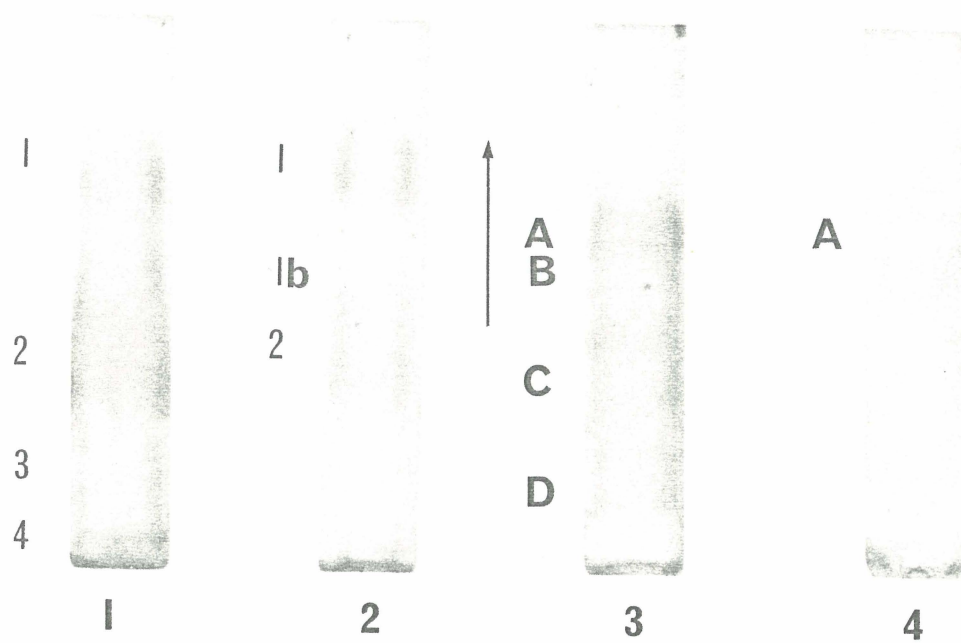


3

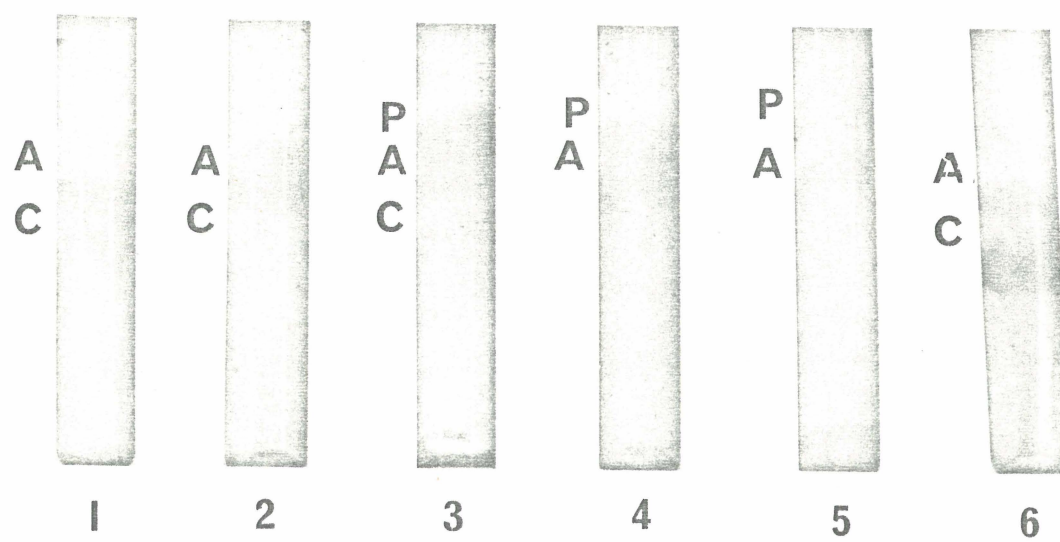


4

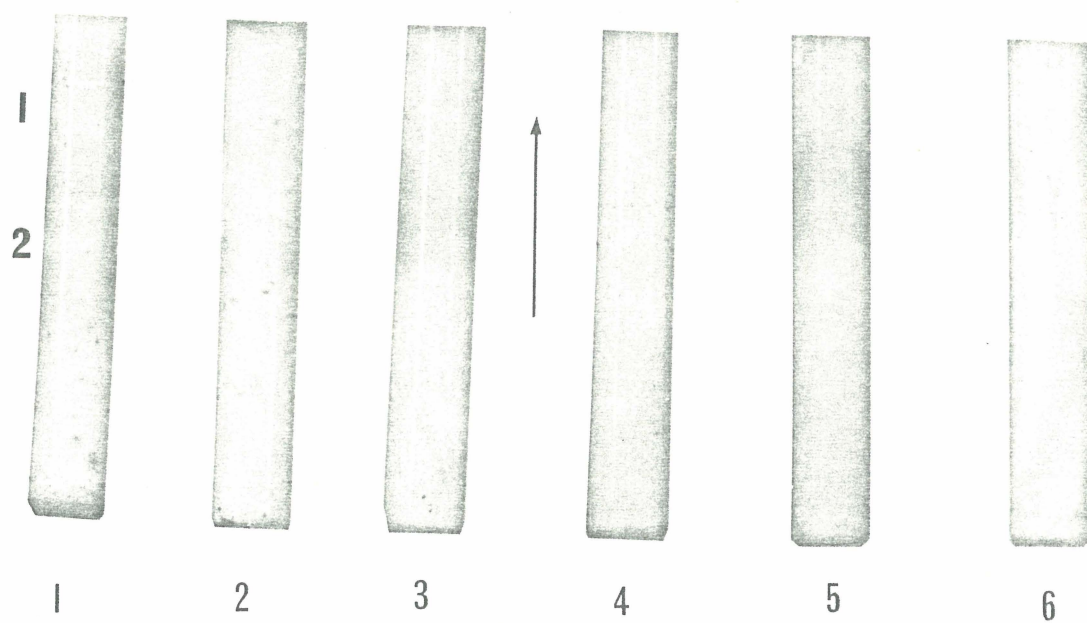
③



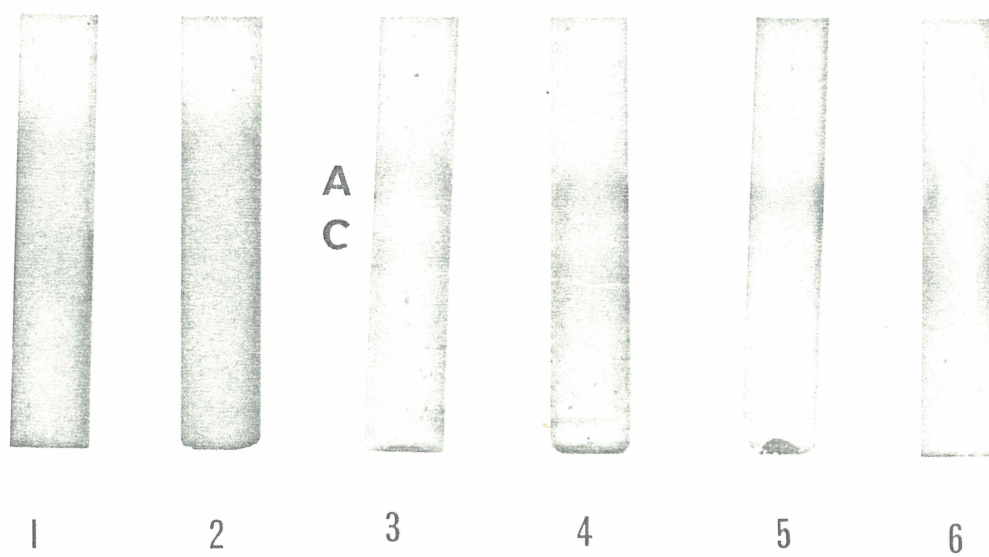
④



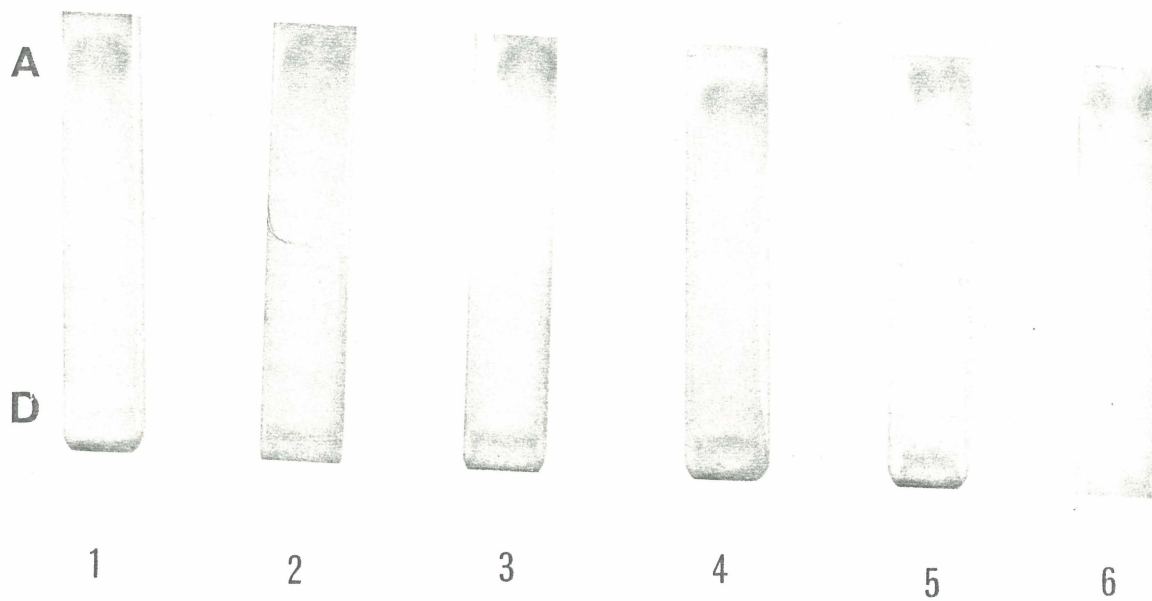
⑤



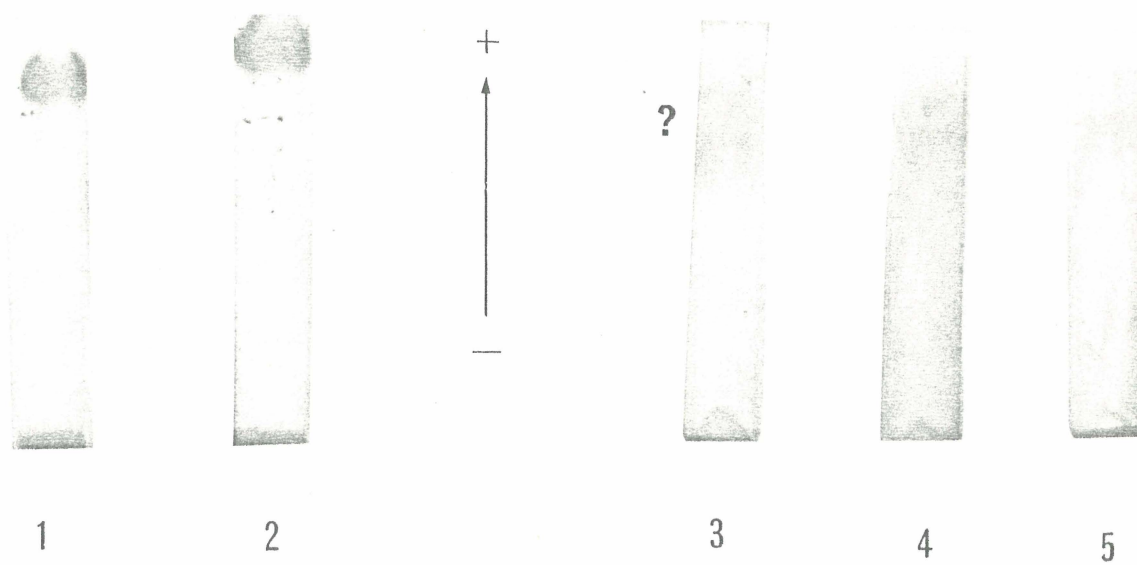
⑥

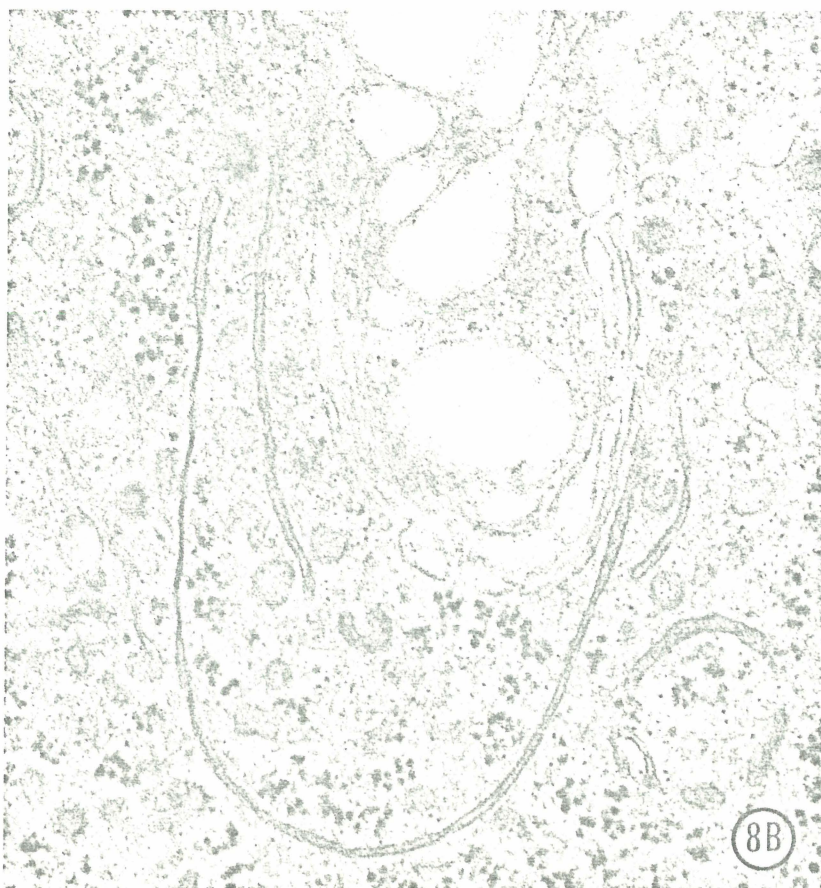
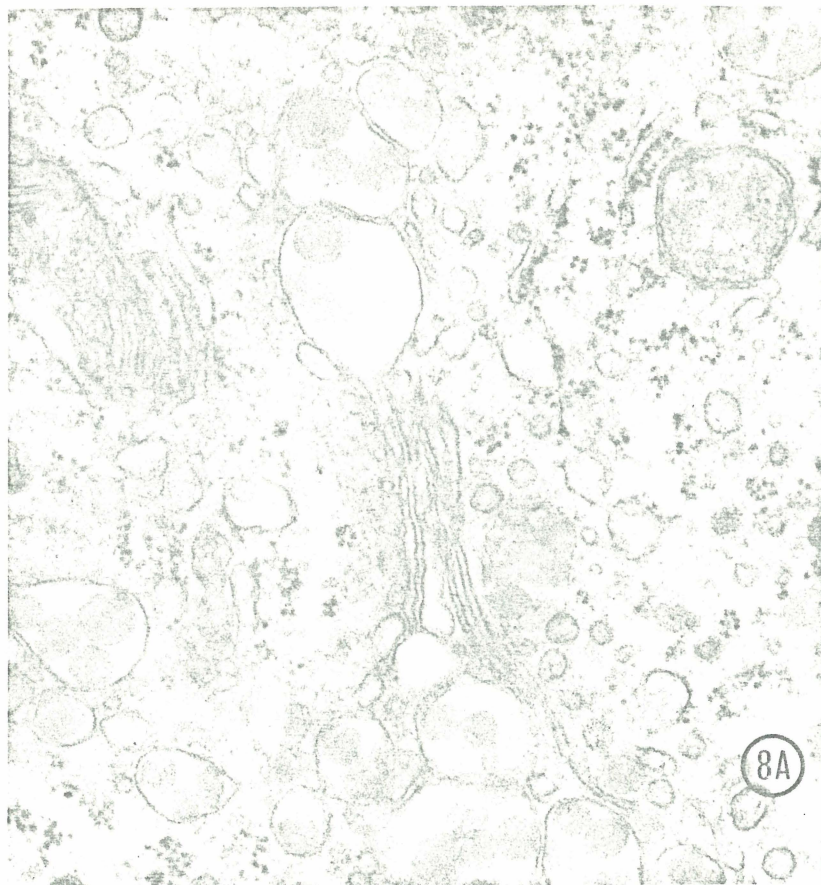


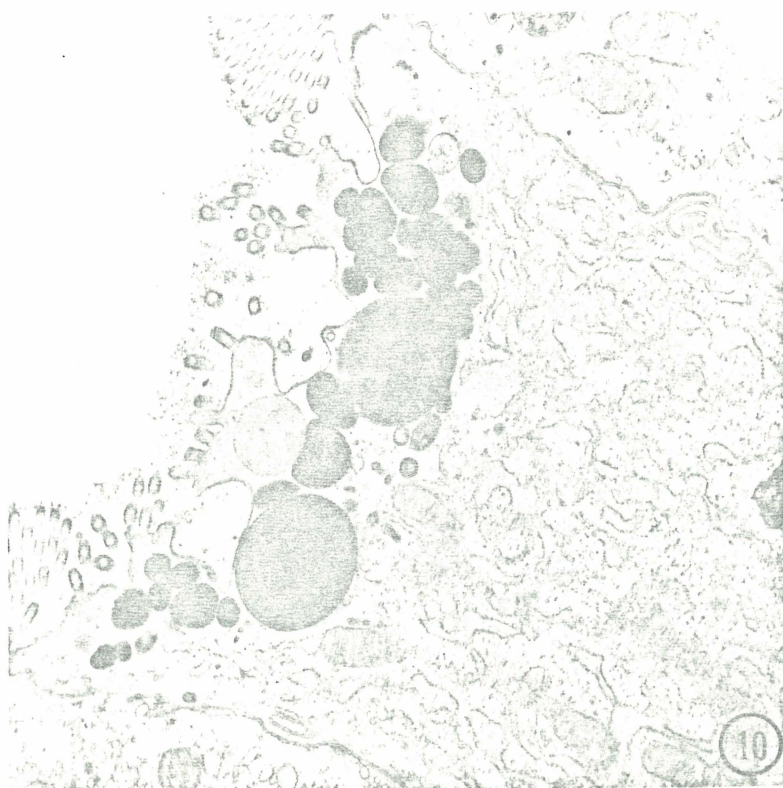
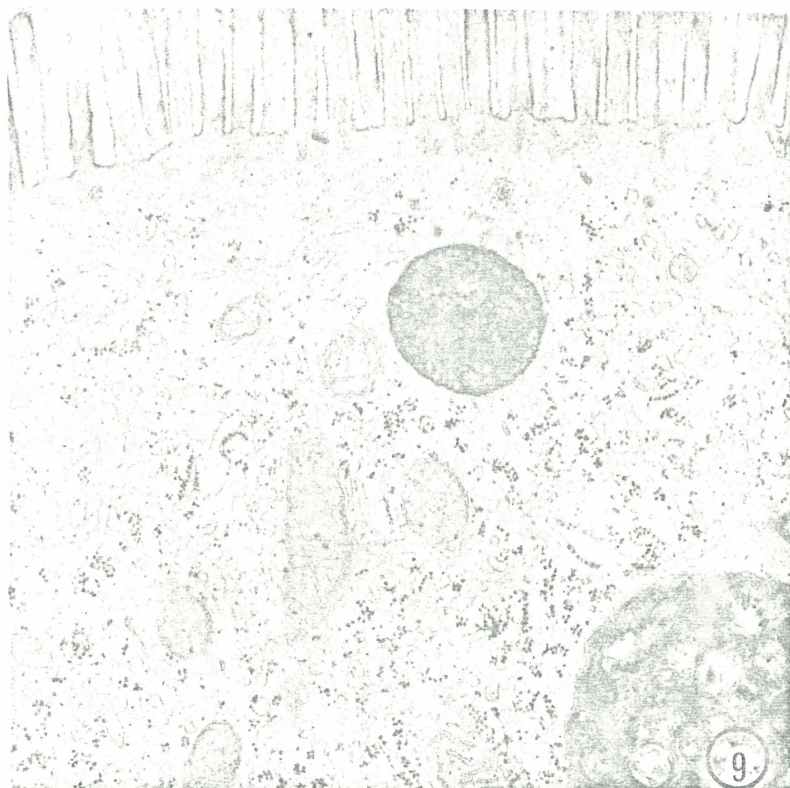
⑦ A

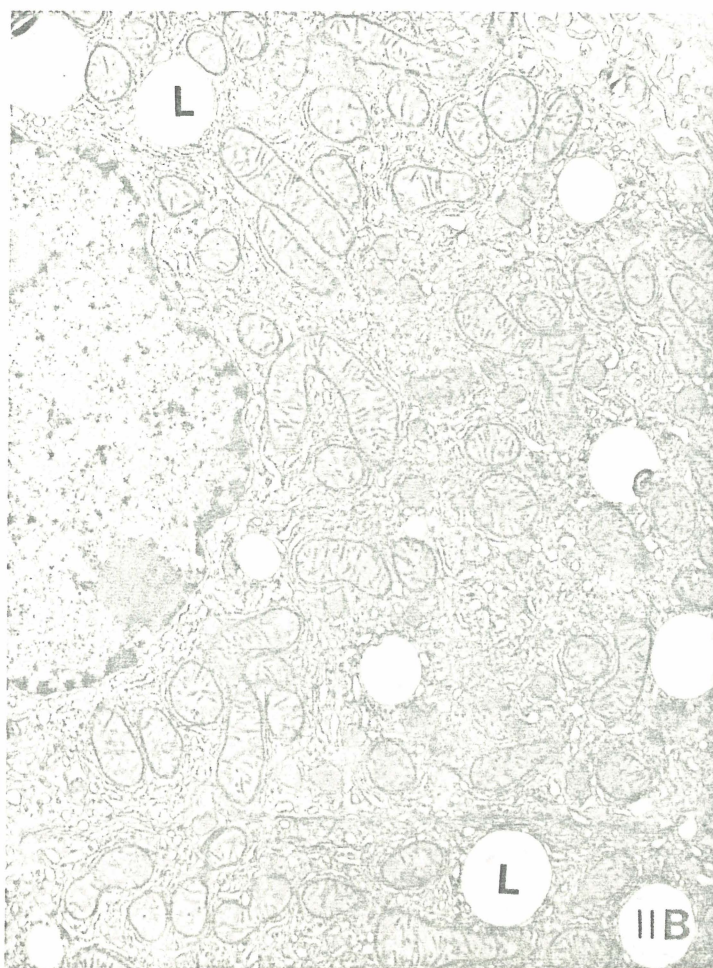
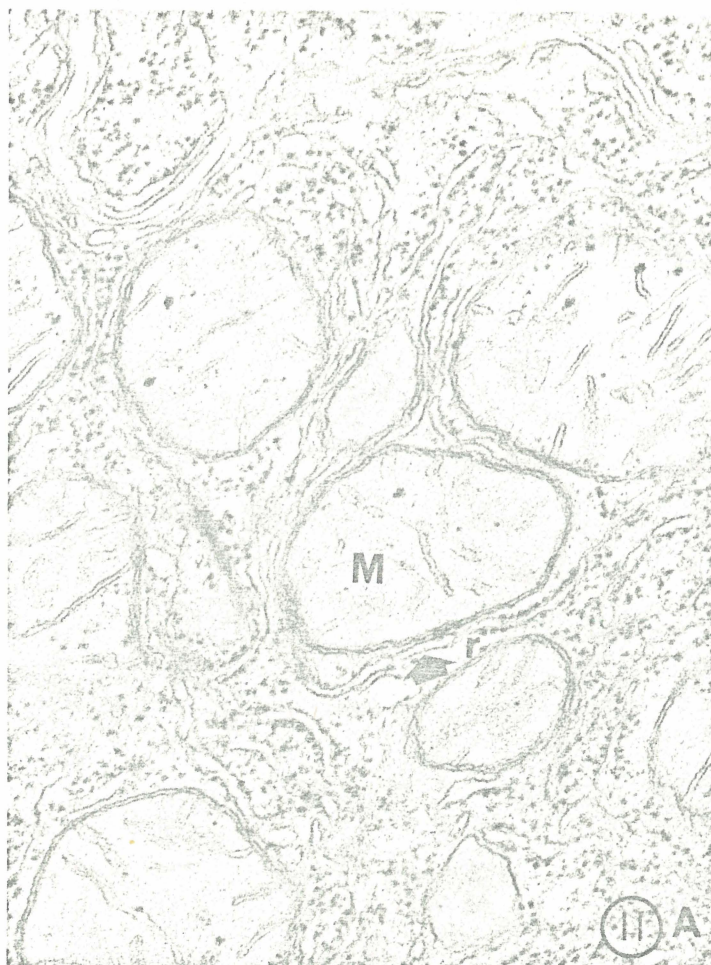


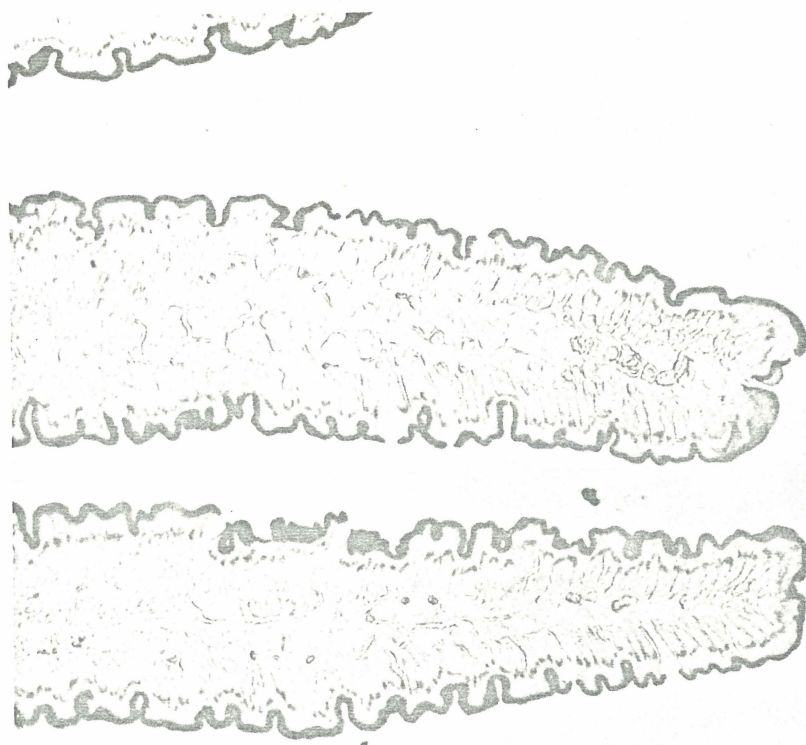
⑦ B



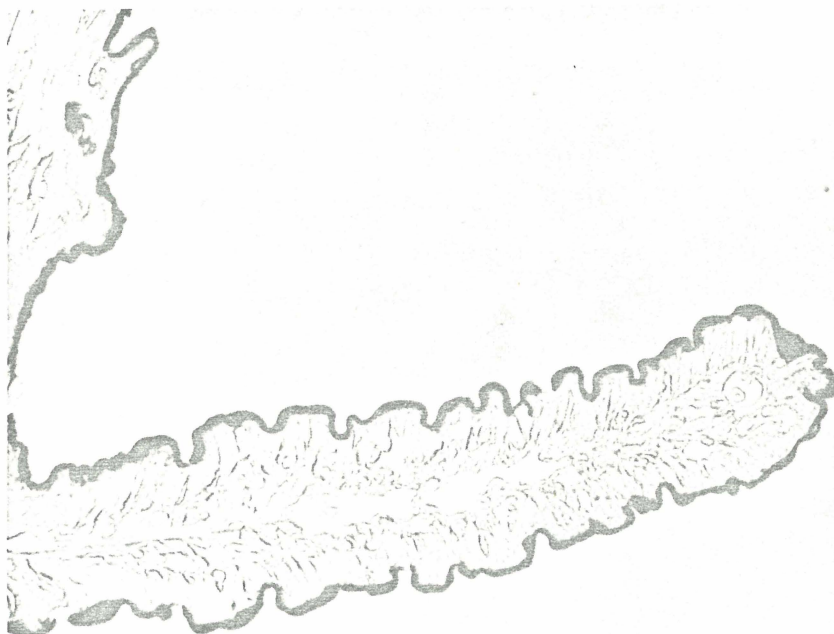








(12) A



(12) B

